استخراج آنزیم آکینینیدین از میوه کیوی و ارزیابی اثر هیدرولیز آن بر زائدات ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchous mykiss*)

حسین خدایی، نیلوفر نعمتی، سید ولی حسینی*

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول: hosseinisv@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۶

چکیده

با وجود میزان نسبتاً بالای صید جهانی ماهی و کارخانجات عمل‌آوری آبزیان، تلاش بسیار کمی برای استفاده از زائدات حاصل از کارخانه-ها صورت گرفته است. در صورتی که اگر این ترکیبات زیستی به نحو مطلوب مورد استفاده قرار گیرند، علاوه بر کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از پسماند آن‌ها، به لحاظ محتوای پروتئینی با ارزش آن‌ها قابل بازیافت می‌باشند. در مطالعه حاضر برای به دست آوردن آنزیمی باصرفه‌ی اقتصادی، آنزیم اکتینیدین از میوه‌ی کیوی استخراج شد. همچنین امعاواحشای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان منبع پروتئینی قابل هیدرولیز در نظر گرفته شد. براساس نتایج، فعالیت آنزیمی ویژه حاصل از عصاره تخلیص شده یک کیلوگرم کیوی ۳۶/۸ mg/u برآورد شد. در اثر هیدرولیز منبع پروتئینی تحت اثر آنزیم اکتینیدین میزان بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیز در هیدرولیزیت امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌ترتیب، ۳۱/۷۷ و ۲۱ درصد بود. همچنین میزان درصد پروتئین خام و خاکستر افزایش و میزان درصد چربی خام کاهش معنی‌دار یافت. براساس نتایج پروفیل اسیدهای آمینه، هیدرولیزیت به‌دست آمده می‌تواند تامین کننده نیازهای پروتئینی قزل آلای رنگین کمان و نیازهای انسان باشد. نتایج نشان می‌دهد که آنزیم اکتینیدین را می‌توان به‌عنوان آنزیم پروتئاز جهت استخراج پروتئین از ضایعات ماهی قزل آلای رنگین کمان در صنایع غذایی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: اکتینیدین، قزل‌آلای رنگین‌کمان، هیدرولیز، آنزیم.

مقدمه

آبزیان به‌عنوان منبعی سرشار از اسیدهای آمینه ضروری و اسیدهای چرب غیراشباع، مواد معدنی و ویتامین‌ها بوده و گزینه مناسبی برای تأمین بخشی از نیازهای غذایی جمعیت رو به افزایش جهان محسوب می‌شوند. ازاین‌رو صنعت آبزی‌پروری از رشد فزاینده-ای در نیم‌قرن اخیر برخوردار شده است، به‌طوری‌که تولید آبزیان اعم از آبزی‌پروری و صید از ۲۰ میلیون تن در سال ۱۹۵۰ به بیش از ۱۶۰ میلیون تن در سال ۲۰۱۲ بالغ گردیده است (FAO, 2014). از این حجم تولید سالانه، حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد آن به-صورت محصولات جانبی شامل سر، امعاء و احشاء، پوست، فلس، باله و استخوان از مصرف انسانی کنار گذاشته می‌شود. این در حالی است که این ضایعات دارای مقادیر قابل‌توجه پروتئین باکیفیت بالا (۱۰ تا ۲۳ درصد وزن ضایعات) می‌باشند (Hsu, 2010).

درگذشته این محصولات به‌عنوان پسماند و ضایعات در نظر گرفته می‌شدند، اما در سال‌های اخیر توجه جهانی به جنبه‌های اقتصادی، زیست‌محیطی و استفاده مطلوب از این محصولات جلب گشته است. بخش زیادی از این محصولات در تولید پودر ماهی و خوراک حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد، بدون این‌که تلاشی برای بازیافت مواد مغذی با ارزش موجود در آن صورت گیرد (Kristinsson and Rasco, 2000; FAO, 2014). اخیراً تلاش‌های زیادی برای استفاده از پسماندهای محصولات جانبی فراوری ماهیان صورت گرفته است (Chalamaiah *et al.*, 2012).

فرآیند هیدرولیز پروتئینی یکی از روش‌های اصلاح کیفیت پروتئین‌ها در راستای افزایش ارزش غذایی و تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌باشد (Chalamaiah *et al.*, 2012). هیدرولیز پروتئین به فرآیندی اطلاق می‌گردد که طی آن پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد تبدیل شده و می‌توان از آن‌ها به‌منظور سنتز پروتئین‌های جدید استفاده نمود. استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک به-منظور اصلاح کیفیت پروتئین‌ها از طریق فرآیند هیدرولیز آنزیمی یکی از بهترین روش‌های تولید

محصولات با ارزش افزوده بالا و کیفیت می‌باشد (Kristinsson and Rasco, 2000).

فرآیند هیدرولیز پروتئینی به دو روش شیمیایی و آنزیمی انجام می‌گردد. هر دو روش دارای مزایا و معایبی می‌باشند. در روش شیمیایی میزان بازگشت محتوای نیتروژنی پایین می‌باشد، زمان فرآیند تقریباً کوتاه‌تر و هزینه‌ی صرف شده کمتر است، اما از سوی دیگری خواص ساختاری به‌دست آمده از این طریق (پپتون‌های بلند زنجیره و توالی آمینواسیدی نامناسب)، نسبت به حالت آنزیمی ضعیف‌تر است که سبب می‌شود با وجود داشتن مزایایی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی، از نظر تغذیه‌ای و کارکردی در رده پایین‌تری قرار بگیرد (Kristinsson and Rasco, 2000). فرآیند هیدرولیز پروتئینی به روش آنزیمی خود به دو صورت هیدرولیز (استفاده از آنزیم‌های خارجی) و اتولیز (استفاده از آنزیم‌های داخلی) صورت می‌پذیرد (Chalamaiah *et al.*, 2012). در طی فرآیند هیدرولیزاسیون پروتئین، آنزیم‌های پروتئولیتک (داخلی یا خارجی) موجب شکستن پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها شده و در نهایت باعث تولید محصولی حاوی اسیدهای‌آمینه آزاد و پپتیدهای کوتاه زنجیره (۲۰-۲ پپتیدی) می‌گردد. هیدرولیزیت تولید شده از طریق فرایند هیدرولیز آنزیمی دارای مزایای زیادی از جمله استفاده به‌عنوان محیط کشت باکتریایی، استفاده در داروهای ضد سرطان، استفاده در جیره غذایی آبزیان به‌جای پودر ماهی، استفاده در افزایش ایمنی بدن ماهی می‌باشد (Kristinsson and Rasco, 2000; Dos Santos *et al.*, 2011). تحقیقات انجام شده این موضوع را نمایان می‌کند که کنترل فرآیند هیدرولیز آنزیمی با آنزیم‌های خارجی برخلاف اتولیز (استفاده از آنزیم‌های داخلی) سبب می‌شود فرایند هیدرولیز در شرایط راحت‌تری صورت پذیرد و هم ویژگی‌های پپتون تولیدی شباهت بیشتری را با آن‌چه که انتظار می‌رود دارا می‌باشد.

با توجه به پژوهش‌های انجام گرفته بر روی خواص آنزیم‌های پروتئاز موجود، می‌توان به منابع آنزیمی میکروبی، جانوری و گیاهی با مثال‌هایی همچون آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم و نئوتراز با منشأ میکروبی، تریپسین و کموتریپسین با منشأ جانوری و آنزیم‌های پاپائین و اکتینیدین با منشأ گیاهی اشاره نمود (Vazques *et al.*, 2003). آنزیم‌های پروتئولیتیک با منشأ گیاهی به‌صورت گسترده مورد مطالعه قرارگرفته‌اند و برای بهبود عملکرد پروتئین‌های ماده غذایی استفاده می‌شوند (خادمی، ۱۳۹۱). از معروف‌ترین آنزیم‌های پروتئولیتیک گیاهی مربوط به مواد غذایی می‌توان به بروملین (آناناس)، پاپایین (پاپایا)، فیسین (انجیر) و اکتینیدین (کیوی) اشاره کرد.

می‌توان گفت فرآیند هیدرولیز پروتئینی یک روش مؤثر در جداسازی پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین ضایعات می‌باشد (Nikoo *et al.*, 2014). پپتیدهای زیست‌فعال که به‌عنوان اجزا پروتئینی مورد بررسی قرار می‌گیرند، در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و پس از آزاد شدن توسط فرآیند هیدرولیز آنزیمی عملکردهای فیزیکی و شیمیایی مختلفی از خود بروز می‌دهند که در نهایت موجب بهبود ویژگی‌های کارکردی، زیست فراهمی و زیست فعالی آن‌ها می‌شود (Dos Santos *et al.*, 2011). از میان بخش‌های مختلف جانبی آبزیان احشاء ماهی منبعی مناسب از نظر پپتیدهای زیست فعال محسوب می‌شود، بر همین اساس به‌عنوان یکی از منابع اصلی برای تولید هیدرولیزیت پروتئینی مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌توان از هیدرولیزیت‌های حاصل از هیدرولیز زائدات ماهی در صنعت استفاده کرد که در پژوهش حاضر ارزیابی اثر هیدرولیز آنزیم اکتینیدین بر روی منبع پروتئینی (زائدات ماهی قزل آلای رنگین کمان) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مراحل اجرای طرح: این پژوهش در دو مرحله شامل مرحله اول استخراج اکتیندین از میوه کیوی به‌عنوان آنزیم هیدرولیز کننده صورت گرفت و در مرحله دوم امعاواحشا ماهی قزل‌آلا به‌عنوان منبع پروتئینی، جهت هیدرولیز تأمین‌شده و تحت تأثیر آنزیم اکتینیدین استحصال شده مرحله اول، قرار گرفت.

استخراج اکتینیدین: اکتینیدین طبق روش McDowall (۱۹۷۰) با کمی تغییرات استخراج و خالص‌سازی شد. تقریباً یک کیلوگرم کیوی پوست-

گیری شده با استفاده از هموژنایزر آزمایشگاهی هم‌ژن گردید و سپس به منظور خارج کردن مواد غیرمحلول، از پارچه‌ی کتان عبور داده شد. خالص‌سازی آنزیم کیوی در سه مرحله عصاره گیری، رسوب‌دهی و تخلیص صورت پذیرفت.

عصاره‌گیری: طبق روش Mostafaie و Chalabi (۲۰۰۴) با مقداری تغییرات ابتدا پوست میوه کنده شد و بخش گوشتی آن‌ها از دانه‌ها جدا گشت، سپس بخش گوشتی (یک کیلوگرم) کاملاً با مخلوط‌کن یکنواخت گردید. عصاره به‌دست‌آمده از چند لایه صافی پارچه‌ای عبور داده شده و یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت، پس از آن به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در g× ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ می‌شود، مایع رویی جمع‌آوری و رسوب آن دور ریخته شد.

رسوب‌دهی: طبق روش McDowall (۱۹۷۰) با کمی تغییرات به عصاره به‌دست‌آمده سولفات آمونیوم با غلظت نهایی ۶۰ درصد اضافه شد. پس از قرارگیری نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دور g×۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گشت. سپس رسوب به‌دست‌آمده در ۳۰ میلی‌لیتر بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH ۵/۵ حل شد و پس از آن در مقابل بافر مربوطه دیالیز شد (کیسه دیالیز با سوراخ ۱۲کیلو دالتون)، که در این حالت محلول دیالیز شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در g×۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا و برای مراحل بعدی نگه‌داری شد.

تخلیص: ۴۰ میلی‌لیتر از محلول به‌دست‌آمده در مرحله رسوب‌دهی که حاوی ۳/۵ میلی‌گرم پروتئین در یک میلی‌لیتر بود، روی ستون کروماتوگرافی دو جداره DEAD-Sephadex با قطر ۵ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر که قبلاً با استفاده از بافر سیترات به‌مدت یک شبانه‌روز به تعادل رسیده، ریخته شد. ستون با استفاده از مقدار کافی از بافر شستشو گردید، به‌طوری‌که میزان جذب مواد خارج شده از ستون در طول موج ۲۸۰ نانومتر به کمتر از ۰/۱ برسد. سپس به‌منظور خروج پروتئین‌های جذب شده در ستون یک گرادیان خطی از نمک NaCl از صفر تا یک مولار در بافر سیترات اعمال شد.

تعیین وزن مولکولی: در نهایت برای بررسی میزان خلوص، محاسبه میزان نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های جدا شده از عصاره میوه کیوی طی مراحل تلخیص، از روش الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد. برای تعیین وزن مولکولی اکتینیدین از پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین (مارکر پروتئینی Bio-Rad) استفاده شد (Jassen, 1994).

تعیین میزان فعالیت آنزیم اکتینیدین: جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم استخراج شده از روش هضم پروتئین کازئین در pH ۵/۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول آنزیمی به ۲ میلی‌لیتر محلول کازئین ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۰۵ مولار، pH ۵/۵ اضافه شد و مخلوط در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. سپس جهت متوقف‌سازی واکنش، ۳ میلی‌لیتر محلول‌تری کلرو استیک اسید (TCA) ۵ درصد به آن اضافه شد و محلول به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید و پس از آن در دور g×۱۲۵۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب مایع رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Jassen, 1994). در واقع فعالیت پروتئاز با اندازه‌گیری جذب نوری اجزاء محلول اسیدی تعیین می‌شود که مقدار تیروزین آزاد شده را نشان می‌دهد. واحد سنجش آن یونیت (unit) است. یک یونیت از فعالیت آنزیم مقدار آنزیمی است که ۱ میکروگرم تیروزین در یک دقیقه، در یک میلی‌لیتر، در ۱۰ درجه سانتی‌گراد آزاد می‌کند (جدول ۱).

تولید هیدرولیزیت پروتئینی

تأمین منبع پروتئینی (امعا واحشا ماهی قزل‌آلا): ضایعات امعاواحشا ماهی قزل‌آلا از یک واحد فروش زنده ماهی قزل‌آلا در کرج خریداری شد و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. پس از انتقال مواد در چرخ‌گوشت چرخ شده و به سرعت به فریز ۱۸- درجه برای ذخیره‌سازی تا زمان هیدرولیز منتقل شدند.

مراحل مختلف تولید هیدرولیزیت‌های پروتئینی: برای تولید هیدرولیزیت پروتئین از روش

جدول ۱- خصوصیات میوه کیوی (در یک کیلوگرم).

ماده	پروتئین کل mg	فعالیت کل Unit	فعالیت ویژه U/mg
عصاره سانتریفیوژ شده	۱۸۱۰۰	۳۳۳۵۰	۱/۸
آنزیم تخلیص شده با DEAD-Sephadex	۵۰۰	۱۸۴۰۰	۳۶/۸

Ovissipour و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۵۰ گرم از هر یک از نمونه مورد مطالعه در ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌متری ریخته و به نسبت ۲:۱ با آب مقطر یک بار تقطیر مخلوط و محلولی همگن ساخته شد و در ادامه pH نمونه‌ها با استفاده از $NaOH_2N$ در حد ۵/۵ تنظیم گردید. سپس به‌منظور غیرفعال سازی آنزیم‌های داخلی، نمونه‌ها در بن ماری قرارگرفته و دما به‌مدت ۲۰ دقیقه تا ۸۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس نمونه‌ها در انکوباتور متحرک با ۲۰۰ دور در دقیقه قرارگرفته و درجه حرارت در حد بهینه فعالیت آنزیم (۶۰ درجه سانتی‌گراد) کاهش یافت. پس از خنک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، با استفاده از سانتریفیوژ نمونه‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g سانتریفیوژ و در نهایت سوپرناتنت جمع‌آوری و با استفاده از فریزدرایر خشک گردید.

خصوصیات هیدرولیزیت‌های پروتئینی

ترکیب شیمیایی: به‌منظور تعیین میزان پروتئین، چربی و خاکستر از روش‌های استاندارد استفاده گردید (AOAC, 2009). برای این منظور از دستگاه کجلدال جهت اندازه‌گیری مقدار نیتروژن مواد خام استفاده شد. مقدار پروتئین محلول در سوپرناتنت نیز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری گردید. برای این منظور روش رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی و قرائت در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش میزان چربی از دستگاه سوکسله استفاده شد. جهت تعیین میزان خاکستر نیز از کوره الکتریکی و دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت استفاده شد.

تعیین پروفیل اسیدهای آمینه: جهت تعیین پروفیل اسیدهای آمینه از روش Hosseini و همکاران (۲۰۰۹) استفاده گردید. در ابتدا یک گرم از نمونه توسط محلول کلروفرم-متانول با نسبت ۲:۱ چربی‌زدایی شده و به‌مدت ۳ ساعت در انکوباتور با محلول متانول-آب ۱:۱ مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به‌وسیله اسیدهیدروکلریک ۶ مولار به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد در آون هیدرولیز شد. پس از آن نمونه از آون خارج و در دمای اتاق سرد گشت. در ادامه تیوپ را باز کرده و آب اضافی از طریق تبخیر تحت خلاء در دمای ۱±۵۰ درجه سانتی‌گراد با دستگاه روتاری خارج و خشک گردید. از نمونه خشک شده برای مشتق‌سازی اسیدهای‌آمینه استفاده شد. در این راستا از ماده فنیل‌ایزوتیوسیانات (PITC) در تیوپ یک میلی‌لیتری استفاده شد. در نهایت میزان اسیدهای آمینه از طریق دستگاه کروماتوگرافی مایع با استفاده از ستون فاز معکوس C_{18} اندازه‌گیری گردید.

محاسبه نرخ کارآیی پروتئین: نرخ کارآیی پروتئین با استفاده از معادلات زیر تعیین شد Kenari و همکاران (۲۰۰۹):

E1 =-۰/۴۶۸ + ۰/۴۵۴ (لایزین) - ۰/۱۰۴ (تیروزین) +
۰/۴۳۵+ (تیروزین) ۰/۹۴۴ - (هیستیدین) ۰/۲۱۱ +
E2 = − ۱/۸۱۶ + (متیونین) + ۰/۷۸۰ (لوسین)
E3 =۰/۰۸۰۸۴ (A) - ۰/۱۰۹۰۴
E4 = ۰/۰۶۳۲۰ (B) - ۰/۱۵۳۹

در این فرمول‌ها A: مجموع اسیدهای آمینه ترئونین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، فنیل-آلانین و لایزسن و B: مجموع اسیدهای‌آمینه A، هیستیدین، آرژنین و تیروزین می‌باشد.

محاسبه شاخص شیمیایی: شاخص شیمیایی از پارامترهای مهم در تعیین ارزش غذایی پروتئین‌ها می‌باشد. شاخص مذکور براساس میزان اسیدهای-آمینه ضروری در پروتئین مورد آزمایش و میزان نیاز آبزیان به اسیدهای آمینه با استفاده از فرمول زیر به-روش Hosseini و همکاران (۲۰۰۹) مورد سنجش قرار گرفت.

$$\text{شاخص شیمیایی} = \frac{\text{میزان اسیدهای آمینه در پروتئین مورد آزمایش}}{\text{میزان اسیدهای آمینه پروتئین استاندارد}}$$

بازیافت نیتروژن: شاخص بازیافت نیتروژن نشان‌دهنده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های از یک ماده می‌باشد و تحت تأثیر خصوصیات ماده موردنظر، شرایط هیدرولیز و فعالیت آنزیم قرار می‌گیرد. این شاخص با استفاده از معادله زیر تعیین شد (Pasupuleti and Demain, 2010):

$$NR = \left(\frac{A \times B}{C \times D}\right) \times 100$$

در این فرمول‌ها A: میزان نیتروژن موجود در پروتئین هیدرولیز شده، B: مقدار پروتئین هیدرولیز شده (گرم)، C: میزان پروتئین نمونه خام و D: مقدار نمونه هیدرولیز شده می‌باشد.

آنالیز آماری: به کمک آزمون کولموگروف-اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از آن به کمک آزمون‌های تحلیل واریانس یک‌طرفه و T مستقل، مقایسه بین داده صورت گرفت و معنی‌دار بودن اختلافات آن‌ها با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS تحت ویندوز نسخه ۱۷ مشخص شد. همچنین نمودارها در نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۴ ترسیم شدند.

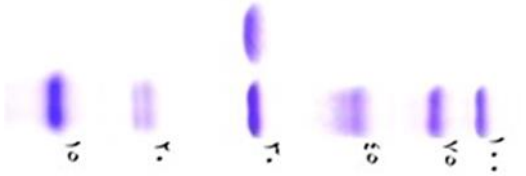
نتایج

در این تحقیق با استفاده از عصاره میوه کیوی، آنزیم پروتئاز اکتینیدین به‌دست آمد. امعاواحشای ماهی قزل‌آلا نیز به‌عنوان منبع پروتئین توسط آنزیم اکتینیدین هیدرولیز شد. طی انجام مراحل آزمایش محتوای آنزیمی و خصوصیات آن، مقدار پروتئین هیدرولیز شده و خصوصیات آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

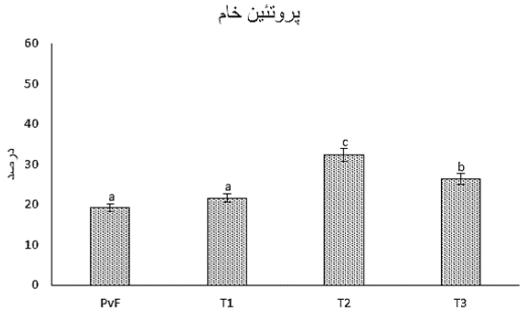
محاسبات و گزارش‌های حاصل از استخراج اکتینیدین

با توجه به نتایج، میزان استخراج پروتئین کل از یک کیلوگرم کیوی، معادل ۵۰۰ mg و مقدار فعالیت آنزیمی ویژه موجود در آن حدود ۳۶/۸ mg/u برآورد شد.

خصوصیات منبع پروتیئنی: آن‌چنان‌که در روش کار بیان شد، سه غلظت از آنزیم استخراج شده (به



شکل ۱ - باندهای مشخص‌شده بر روی SDS-PAGE؛ پایین باندهای مارکرهای وزنی، بالا باند آنزیم اکتینیدین جداسازی شده.



شکل ۲ - مقایسه میانگین (± انحراف معیار) درصد پروتئین خام در منابع پروتئین بدون تیمار و تحت اثر هیدرولیز آنزیمی با غلظت‌های آنزیمی ۵ (T_1)، ۱۰ (T_2) و ۱۵ (T_3) میلی‌گرم. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

ترتیب ۵، ۱۰ و ۱۵ mg تحت عنوان T_1، T_2و T_3) بر روی وزن ثابت منبع پروتئینی (۵۰/۰ gr) مورد ارزیابی قرار گرفت. در طی آزمایش نتایج سنجش و مقایسه ترکیب شیمیایی امعاواحشای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمانی به‌عنوان منبع پروتئین بدون تیمار و تغییر و امعاواحشای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمانی تحت اثر هیدرولیز آنزیمی ارائه شد (شکل ۱).

ترکیب شیمیایی: نتایج حاصل از هیدرولیز آنزیمی منبع میزان درصد پروتئین خام، چربی خام و خاکستر در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نمایش داده شده‌اند. نتایج افزایش معنی‌دار میزان پروتئین خام در هیدرولیزیت‌های تحت اثر آنزیم اکتینیدین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم را در مقایسه با منبع پروتئین بدون تیمار و هیدرولیزیت‌های تحت اثر آنزیم اکتینیدین با غلظت‌های ۵ و ۱۵ میلی‌گرم را نشان می‌دهند (P<۰/۰۵). همچنین هیدرولیزیت‌های تحت اثر آنزیم اکتینیدین با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در مقایسه با منبع پروتئین بدون تیمار و هیدرولیزیت‌های تحت اثر آنزیم اکتینیدین با غلظت‌های ۵ میلی‌گرم اختلاف معنی‌دار نشان دادند (P<۰/۰۵).

پروتئین (امعاواحشا ماهی قزل‌آلا) در سه غلظت

جدول ۲- نرخ کارآیی پروتئین در هیدرولیزیت منبع پروتئینی.

معادلات	منبع پروتئین هیدرولیز شده
معادله ۱	۰/۰۵۱
معادله ۲	۰/۳۹
معادله۳	۰/۸۵
معادله۴	۰/۸۹

معادله ۱ E1 = -۰/۴۶۸ + ۰/۴۵۴ (لایزین) - ۰/۱۰۴ (تیروزین)

معادله ۲ E2 = – ۱/۸۱۶ + (متیونین) ۰/۷۸۰ + (لوسین) ۰/۲۱۱ (هیستیدین) - ۰/۹۴۴ (تیروزین) + ۰/۴۳۵

معادله ۳ E3 =۰/۰۸۰۸۴ (A) - ۰/۱۰۹۰۴

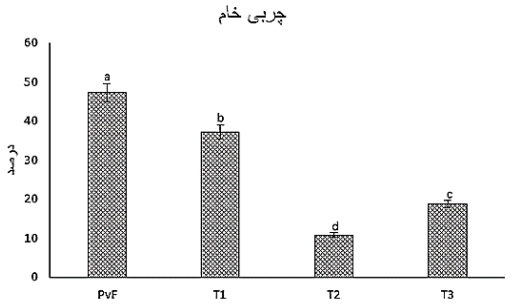
معادله ۴ E4 = ۰/۰۶۳۲۰ (B) - ۰/۱۵۳۹

جدول ۳- شاخص شیمیایی در هیرزولیزیت پروتئینی امعاواحشا ماهی قزل‌آلا با پروتئین‌های مرجع نیاز انسانی و نیاز ماهی قزل‌آلای ۱۵۰-۲۰۰ گرمی برحسب ماده خشک در جیره.

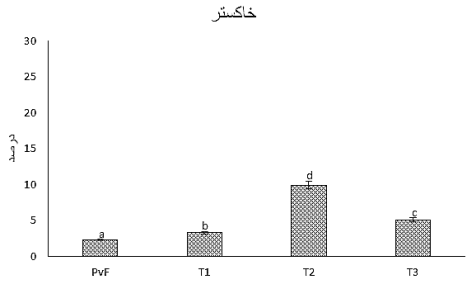
اسیدهای‌آمینه	پروتئین مرجع[1]	هیدرولیز منبع پروتئین	پروتئین مرجع[2]	هیدرولیز منبع پروتئین
آرژنین	-		۱/۵	۱/۲۰
هیستیدین	۱/۶	۰/۵۳	۰/۸	۱/۰۷
ایزولوسین	۱/۳	۰/۹۷	۱/۱	۱/۱۵
لوسین	۱/۹	۱/۱۳	۱/۵	۱/۴۳
لیزین	۱/۶	۱/۴۹	۲/۴	۰/۹۹
متیونین	۱/۷	۰/۴۸	۰/۷	۱/۱۶
فنیل‌آلانین	۱/۹	۰/۶۶	۰/۹	۱/۳۸
ترئونین	۰/۹	۱/۴۹	۱/۱	۱/۲۲
والین	۱/۳	۱/۱۰	۱/۲	۱/۱۹
متیونین+ترئونین	-		۱/۱	۱/۹۷
فنیل‌آلانین+تیروزین	-		۱/۸	۱/۴۷

پروتئین مرجع۱: نیاز انسان بالغ به اسیدهای آمینه مختلف برحسب درصد ماده خشک (FAO/WHO/UNU, 2007)

پروتئین مرجع۲: نیاز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (به وزن ۱۵۰۰-۲۰۰ گرم) به اسیدهای آمینه مختلف برحسب درصد ماده خشک در جیره (NRC, 2011).



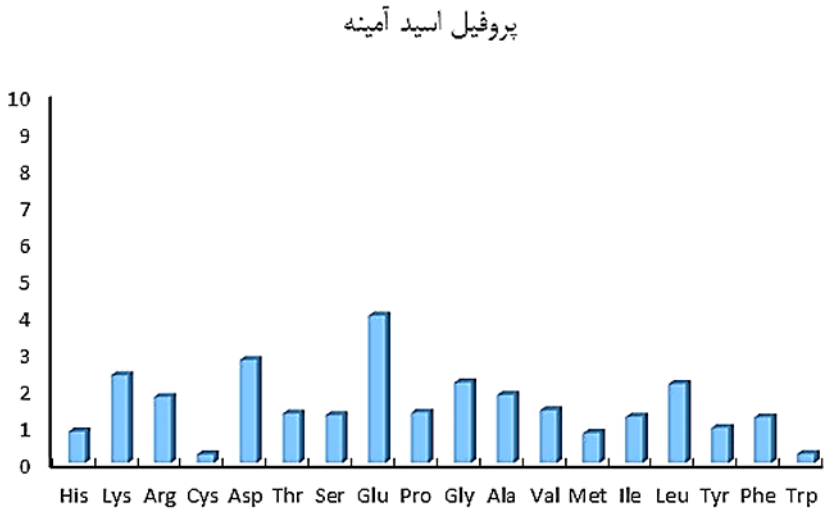
شکل ۳ - مقایسه میانگین (±انحراف معیار) درصد چربی خام در منابع پروتئین بدون تیمار و تحت اثر هیدرولیز آنزیمی با غلظت‌های آنزیمی ۵(T1)، ۱۰(T2) و ۱۵(T3) میلی‌گرم. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۴ - مقایسه میانگین (± انحراف معیار) درصد خاکستر خام در منابع پروتئین بدون تیمار و تحت اثر هیدرولیز آنزیمی با غلظت‌های آنزیمی ۵(T1)، ۱۰(T2) و ۱۵(T3) میلی‌گرم. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

آنزیمی با توجه به نتایج این بخش کاهش معنی‌دار چربی خام، در تمامی هیدرولیزیت‌های تحت اثر آنزیم اکتینیدین با غلظت سه غلظت و همچنین بدون تیمار را نمایش می‌دهد (P<۰/۰۵). نتایج سنجش خاکستر، افزایش معنی‌دار در تمامی هیدرولیزیت‌های تحت اثر آنزیم اکتینیدین با سه غلظت و همچنین بدون تیمار را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). با تکیه بر عملکرد آنزیم اکتینیدین، بازیافت نیتروژنی ۲۳/۳۰ درصد و درجه هیدرولیز ۳۱/۷۷ درصد برآورد شد.

پروفیل اسیدهای‌آمینه: با توجه به راندمان افزایش پروتئین طی اثر سه غلظت آنزیم اکتینیدین، هیدرولیز پروتئینی تحت تأثیر غلظت میانی (۱۰



شکل ۵ – اسیدهای‌آمینه در هیدرولیزیت منبع پروتئینی (امعاواحشا ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان).

میلی‌گرم اکتینیدین) به‌عنوان منبع پروتئینی مورد استفاده در این تحقیق مورد مطالعه جزئی‌تر قرار گرفت. از این‌رو اسیدهای‌آمینه در هیدرولیزیت منبع پروتئینی (امعاواحشا ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان) در شکل ۵ ارائه شده است.

نرخ کارآیی پروتئین: نتایج نرخ کارآیی پروتئین در هیدرولیزیت منبع پروتئینی در جدول ۲ ارائه شده است. بالاترین نرخ کارایی پروتئین ۲/۴۳ و کمترین آن ۰/۷۹ بود.

شاخص شیمیایی: به‌منظور تعیین شاخص شیمیایی هیدرولیزیت به‌دست‌آمده، نتایج حاصل از آنالیز اسیدآمینه‌های منبع پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با دو مرجع پروتئینی در جدول ۳ ارائه می‌گردد.

بحث

میزان استخراج پروتئین کل از یک کیلوگرم کیوی، معادل mg ۵۰۰ و مقدار فعالیت آنزیمی ویژه موجود در آن حدود mg/u ۳۶/۸ برآورد شد. که با مطالعات Caren و Moore (۱۹۷۸)، Aminlari و همکاران (۲۰۰۹) و Sugiama و همکاران (۱۹۹۶) همخوانی دارد. آن‌چنان‌که Caren و Moore (۱۹۷۸) با استخراج عصاره پروتئینی و آنزیم تخلیص شده از یک کیلوگرم میوه به‌ترتیب میزان ۱۴۵۰۰ و ۳۰۰ mg/Kg را گزارش نمودند. Aminlari و همکاران (۲۰۰۹) در طی آزمایش خود پروتئین کل به مقدار ۱۶ میلی‌گرم و پس از تخلیص mg ۳/۴۳ در ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره میوه کیوی استخراج نمودند. Sugiama و همکاران (۱۹۹۶) در آزمایش خود از ۴۳۰ میلی‌لیتر عصاره کیوی مقدار ۲۰۴ میلی‌گرم پروتئین استخراج نمودند. نتایج حاصل از برآورد ترکیب شیمیایی (درصد پروتئین خام، چربی خام و خاکستر) قبل و بعد از انجام هیدرولیز توسط اکتینیدین مؤید افزایش درصد پروتئین و خاکستر و کاهش چربی در تمامی موارد هیدرولیز شده تحت اثر آنزیم می‌باشند.

بیشترین راندمان افزایشی درصد پروتئین خام و کمترین راندمان کاهشی درصد چربی خام، در تیمار منبع پروتئینی تحت تأثیر ۱۰ میلی‌گرم اکتینیدین به ترتیب با مقادیر ۶۷/۰۳ و ۷۷/۱۰ درصد مشاهده شد که ناشی از عملکرد هیدرولیزی بهینه مقدار آنزیم اکتینیدین در نظر گرفته‌شده، بر مقدار معین پروتئین می‌باشد. این نتایج هماهنگ با مطالعات حصاری و همکاران (۱۳۸۹) می‌باشد که در طی پژوهش خود جهت بررسی عملکرد بهینه آنزیم اکتیندیدین به‌عنوان پروتئاز و کلاژناز، قطعه‌ای از آئورت را در ابعاد ۱*۲*۱ میلی‌متر مکعب را در حضور غلظت‌های متفاوت اکتیندین قرار دادند. نتیجه آن‌ها در عملکرد آنزیمی اکتیندین به این صورت گزارش گردید که غلظت زیر ۵ میلی‌گرم، کارایی مناسب در هیدرولیز نداشته و غلظت‌های بالای ۱۰ میلی‌گرم، به علت کاهش بقای سلول و اجزای آن نیز مناسب نمی‌باشد.

همچنین در مطالعات Benjakul و همکاران (۲۰۱۴)، Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹)، جعفری‌تراجی و همکاران (۱۳۹۴)، Asmpo و همکاران (۲۰۰۵)، Santos و همکاران (۲۰۱۱) و Safari و همکاران (۲۰۱۲) در ترکیب درصد پروتئین خام، چربی خام و خاکستر، قبل و بعد از هیدرولیز منبع پروتئینی اختلاف معنی‌دار گزارش شده است، که با یافته‌های این پژوهش هماهنگ می‌باشد و نشان‌دهنده عملکرد آنزیم اکتینیدین در نقش پروتئاز و کلاژناز است. میزان بالای پروتئین در هیدرولیزیت مربوط به محلول‌شدن پروتئین‌ها طی فرآیند هیدرولیز می‌باشد (Chalamaiah *et al*., 2012; Chalamaiah *et al*., 2015) و بازیافت پروتئین نشان‌دهنده توانایی جداسازی پروتئین‌ها از مواد خام و محلول‌سازی آن‌ها در فاز مایع است. همچنین بازیافت نیتروژن دارای رابطه مستقیمی با درجه هیدرولیز است و با افزایش درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد (Ovissipour *et al*., 2009). در این مطالعه میزان بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیز در هیدرولیزیت امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمانی تحت اثر آنزیم اکتینیدین، ۳۱/۷۷ و ۲۱ درصد بود. Ovissipour و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه خود به وسیله هیدرولیز آنزیمی، میزان چربی در هیدرولیزیت پروتئینی حاصل از امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله را تا ۱/۵ درصد کاهش داده‌اند. اما در تحقیق حاضر حداکثر کاهش چربی ۵/۸۳ درصد بود که می‌تواند ناشی از عملکرد آنزیم اکتینیدین و همچنین شرایط متفاوت محیطی واکنش باشد. شاخص شیمیایی از پارامترهای بررسی ارزش غذایی یک پروتئین می‌باشد که براساس ترکیب اسیدهای آمینه تعیین می‌گردد. ارزش غذایی یک ترکیب به ظرفیت پروتئین‌ها جهت پاسخگویی به نیاز موجودات زنده با توجه به اسیدهای‌آمینه ضروری بستگی دارد. بنابراین برای ارزیابی کیفیت، درجه جذب و هضم یک پروتئین، یک شاخص شیمیایی تعیین می‌گردد. این شاخص نشان‌دهنده نسبت بین اسیدهای‌آمینه ضروری نمونه مورد آزمایش و اسیدهای آمینه ضروری پروتئین استاندارد می‌باشد (Meli, 2013).

اگر سطح اسیدآمینه محدودکننده در جیره ماهی نسبت به استاندارد FAO حتی تا ۳۰ درصد کمتر باشد، هیدرولیزیت پروتئینی قادر به تأمین نیاز ماهی می‌باشد (Bhaskar *et al*., 2008). همچنین Ovissipour و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه امعا و احشا ماهی تون بیان داشتند که هیدرولیزیت پروتئینی حاصل از هیدرولیز آنزیمی امعاء و احشاء ماهی تون قادر به تأمین نیازهای یک انسان بالغ می‌باشد. از سوی دیگر Bashkar و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند که اسیدآمینه متیونین در هیدرولیزیت امعاء و احشاء ماهی کاتلا (*Catla catla*) نسبت به نیازهای ماهی کپور و انسان محدودکننده می‌باشد و علیرغم کاهش برخی از اسیدهای آمینه در پروتئین هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه، پروتئین هیدرولیز شده دارای ارزش غذایی بالایی بوده و به‌دلیل سرعت جذب بالا در دستگاه گوارش، بسیار مورد توجه می‌باشد. در این تحقیق نیز هیدرولیزیت‌های پروتئینی تولید شده می‌تواند تأمین‌کننده نیاز اسیدآمینه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمانی و انسان باشد. در پژوهش حاضر آزمایش‌های طی دو مرحله صورت پذیرفت. مرحله اول، استخراج و خالص‌سازی آنزیم اکتینیدین و بررسی خصوصیات آنزیم استحصال‌شده، مرحله دوم، استفاده از امعاواحشای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمانی به‌عنوان منبع پروتئینی و هیدرولیز آن تحت تأثیر آنزیم اکتینیدین و بیان خصوصیات هیدرولیزیت به‌دست‌آمده پرداخته شد که نتایج به دست‌آمده نشان‌گر قابلیت استفاده از کیوی در تهیه آنزیم اکتینیدین با هزینه کمتر بوده و عملکرد این آنزیم را بر روی منابع پروتئینی به‌عنوان پروتئاز تأیید می‌نماید. بنابراین می‌توان با استفاده از آنزیم اکتینیدین در هیدرولیز امعاواحشای ماهی قزل‌آلا جهت تأمین اسیدآمینه‌ها و هیدرولیزیت‌های مورد استفاده در صنایع دیگر بهره برد.

منابع

خادمی آ. ۱۳۹۳، تولید نوشیدنی عملگرا بر پایه پروتین‌های هیدرولیز شده آب پنیر. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته علوم و صنایع غذایی – شیمی مواد غذایی، دانشگاه شیراز. صفحات ۳۶-۲۱.

جعفری ترابی ر.، عالیشاهی ع.، اجاق م.، اسماعیل ملا ع. ۱۳۹۴، تولید پروتیئن هیدرولیز شده از زائدات تاس ماهی سیبری پرورشی و استفاده از آن به عنوان

محیط کشت باکتری. فصل نلمه علمی پژوهشی، دوره ۴، شماره ۳، صفحات ۵۹-۴۷.

حصاری م.، شاهسونی د.، شفیعی ش. ۱۳۸۶. تعیین و مقایسه ترکیبات تقریبی عضله چهارگونه کفال ماهیان ایران. مجله زیست شناسی دریا، دوره ۸، شماره ۳۱، صفحات ۱۳۲-۱۲۶.

AOAC. 2002. Official Methods of Analysis, (Sixteenth Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

Aminlari M., Shekarforoush S.S., Gheisari H.R., Golestan L. 2009. Effect of actinidin on the protein solubility, water holding capacity, texture, electrophoretic pattern of beef, and on the quality attributes of a sausage product. *Journal of Food Science* 74(3), C221-6

Aspmo S.I., Horn S.J., Eijsink V.G. 2005. Hydrolysates from Atlantic cod (Gadus morhua) viscera as components of microbial growth media. *Process Biochemistry* 40, 3714-3722.

Baker E.N. 1977. Structure of actinidin details of the polypeptide chain conformation & active site from an electron density map at 2.8 A resolution. *Journal of Molecular Biology* 115, 263-77.

Baker E.N. 1980. Structure of actinidin, after refinement at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 141, 441-484.

Benjakul B., Morrissey M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 45, 3424.

Benjakul S., Yarnpakdee S., Senphan T., Halldorsdottir S.M., Kristinsson H.G. 2014. Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. *Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods* 237, 237-83.

Bhaskar N., Benila T., Radha C., Lalitha R.G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology* 99, 335-343.

Blenford D.E. 1994. Protein hydrolysates: functionalities and uses in nutritional products. *International food ingredients* 45.

Boland M.J., Hardman M.J. 1972. Kinetic studies on the thiol protease from Actinidia chinensis. *FEBS Letters* 27(2), 282-284

Carne A., Moore C.H. 1978. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of actinidia chinensis. *Biochemical Journal* 173, 73-83.

Chalamaiah M., Rao G.N., Rao D., Jyothirmayi T. 2010. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food chemistry* 120, 652-657.

Chemists A.O.O.A. 2009. Official methods of analysis, Washington, DC.

Dufosseé L., De la Broise D., Guérard F., 2001. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. *Current Microbiology* 42: 32-38.

Dos Santos S.D.A., Martins V.G., Salas-mellado M., 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, 1399-1406.

Fallah M., Bahram S., Javadian S.R. 2015. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. *Food Science and Nutrition* 3, 153-157.

FAO. 2008. Food and agricultural organisation of the United Nations. Year book of fishery statistics. Rome. 98 p.

FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Rome, Italy.

Harnedy P.A., Fitzgerald R.J. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review. *Journal of Functional Foods* 4, 6-24.

Horn S., Aspmo S., Eijsink V. 2005. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1082-1089.

Horn S.J., Aspmo S.I., Eijsink V.G. 2007. Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1328-1334.

Hosseini S.V., Arlindo S., Böhme K., Fernández-No C., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J. 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing Enterococcus faecium strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1392-1403.

Sciences 3, 223-30.

Nesse K.O., Nagalakshmi A., Marimuthu P., Singh M. 2011. Efficacy of a fish protein hydrolysate in malnourished children. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26, 360-365.

Nikoo M., Benjakul S., Ehsani A., Jing L., Wu F.F., Yang N., Xu B., Jin Z., Xu X. 2014. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods* 7, 609-620.

Nolse H., Undeland I. 2009. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. *Food and Bioprocess Technology* 2, 1-27.

Ovissipour M., Safari R., Motamedzadegan A., SHabanpour B. 2012. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology* 5, 460-465.

Pasupuleti V.K., Demain A.L. 2010. Protein hydrolysates in biotechnology, Springer Science & Business Media. 229 p.

Paul W., Amiss J., Try R., Praekelt U., Scott R., Smith H. 1995. Correct processing of the kiwifruit protease actinidin in transgenic tobacco requires the presence of the C-terminal propeptide. *Plant Physiology* 108, 261-268.

Quaglia G., Orban E. 1987. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 38, 271-276.

Safari R., motamedzadegan A., Ovissipour M., Regenstein J., Gildberg A., Rasco B. 2012. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology* 5, 73-79.

Sarmadi B.H., Hsmail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 31, 1949-1956.

Sugiyama S., Hirota A., Okada C., Yorita T., Sato K., Ohtsuki K. 2005. Effect of kiwifruit juice on beef collagen. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 51(1), 27-33.

Sugiyama S., Ohtsuki K., Sato K., Kawabata M. 1996. Purification and characterization of six kiwi fruit proteases isolated with two ion-exchange resins, toyopearl-superq and bakerbond WP-PEI. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60(12),

Hsu, K. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry* 122: 42–48.

Kenari A.A., Regenstein J.M., Hosseini S.V., Rezaei M., Tahergorabi R., Nazari R.M., Mogaddasi M., Kaboli S.A. 2009. Amino acid and fatty acid composition of cultured Beluga (*Huso huso*) of different ages. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 18, 245-265.

Kristinsson H.G., Rasco B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40, 43-81.

Kolkovski S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.

Lazzi C., Meli F., Lambertini F., Bottesini C., Nikolaev I., Gatti M., Sforza S., Koroleva O., Popov V., Neviani E. 2013. Growth promotion of Bifidobacterium and Lactobacillus species by proteinaceous hydrolysates derived from poultry processing leftovers. *International Journal of food Science and Technology* 48, 341-349.

Lohpei Shian M., Nur A.S.B., Tingl Y., Taher M., Fadzilah A.A.M. 2003. Pilot scale extraction proteolytic enzyme bromelain from pineapple (annas comosus). In: 2nd International Conference on Chemical and Bioprocess Engineering in conjunction with 19th Symposium of Malaysian Chemical Engineers (SOMChE 2005), 8-10 December 2005, Kota Kinabalu, Sabah.

Makanjuola O.M. 2012. Chemical analysis of flesh and some body parts of different fresh fish in South West Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition* 11(1), 14-1

McDowell R.H. 1970. New reactions of propylene glycolalginate. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 21, 4-41.

Meli, F. 2013. Poultry Industry Waste: Protein hydrolizates as growth stimulator for microorganisms potentially probiotic. Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Scienze degli Alimenti.

Mostafaie A., Chalabi M., Ferdosi M.E. 2004. Purification of kiwifruit actinidin and examination of its proteolytic activity. *Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical*

1994-2000.

Vázquez-Lara L, Tello-Solis SR, Gomez-Ruiz L, Garcia-Garibay M, Rodriguez-Serrano GM. 2003. Degradation of α-Lactalbumin and B-Lactoglobulin by Actinidin. Food Biotechnology 17, 117-128.

Wang Z-Y., MacRae E.A., Wright M.A., Bolitho K.M., Ross G.S., Atkinson R.G. 2000. Polygalacturonase gene expression in kiwifruit: relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant Molecular Biology* 42, 317-328.

Watts A.B., Brocklehurst K. 2004. Actinidin. In: Handbook of proteolytic enzymes, 2nd edn. A.J. Barrett, N.D., Rawlings, J.F. Woessner (Eds.). Academic Press: London. pp. 1143-1146.

Extraction of actinidine enzyme from kiwi fruit and evaluation of its hydrolysis effect on the waste products of Rainbow trout (*Oncorhynchous mykiss*)

Hosein Khodaee, Nilofar Nemati, Seyed Vali Hoseini*

Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
*Corresponding author: hosseinisv@ut.ac.ir

Received: 2019/4/7 Accepted: 2019/5/27

Abstract

Despite a high levels of global fishing and the related processing industrie, little efforts have been made to recycle waste products of these factories. If these biological compounds be properly processed, they can reduce the environmental pollution resulted due to such a wastes, and their valuable protein content can be recycled. Therefore the present study was conducted to obtain an economically valuable enzyme i.e. acinidine enzyme from Kiwi fruit. In addition, Rainbow trout waste was considered as a potential source of hydrolysable protein. Based on the results, the specific enzyme activity of the 1 kg of kiwi fruit was estimated as 36.8 mg/u. As a result of protein source hydrolysis by applying the actinidine enzyme, the rate of nitrogen recovery and the degree of rainbow trout hydrolysis were recorded as 31.77 and 21%, respectively. Furtheremoe, the results showed that the percentage of crude protein and ash content increas, however, the crude fat percentage decreases. Based on the results of the amino acid profile analysis, these hydrolysates can be provide the proteins of human and Rainbow trout. The results indicated that the actinidine enzyme can be used as a protease enzyme to extract protein from Rainbow trout wastes in the food industry.

Keywords: Actinidin, Rainbow trout, Hydrolysis, Enzyme.