Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics
Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

انجمن علمی ماهیان زینتی ایران
Iranian Ornamental Fish Society (IOFS)

(OPEN ACCESS)

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

Shima Khalatbari[1], Maryam Hasani[*2], Morteza Khoshvaght-Aliabadi[3]

1. Ph.D. Student in 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. Professor, Dept. of Chemical Engineering, Sha. C., Islamic Azad University, Shahrood, Iran. E-mail: mkhaliabadi@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 02.14.2025
Revised: 04.01.2025
Accepted: 04.27.2025

Keywords:
Alcalase,
Bacillus salsus,
Foam stability,
Protein hydrolysis,
Shrimp waste

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 salusus* 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 salsus*. 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 salsus* can be used as a new, economical and efficient replacement for the alcalase enzyme.

Cite this article: Khalatbari, Shima, Hasani, Maryam, Khoshvaght-Aliabadi, Morteza. 2026. Investigating the efficiency of an enzyme extracted from *Bacillus salsus* as an alternative to alcalase in the hydrolysis of shrimp waste protein. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (4), 39-58.

© The Author(s).
Doi: 10.22069/japu.2025.23325.1929
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

بررسی کارایی آنزیم استخراجی از باکتری باسیلوس سالسوس به‌عنوان جایگزین آلکالاز در هیدرولیز پروتئین ضایعات میگو

شیما خلعتبری[۱]، مریم حسنی*[۲]، مرتضی خوشوقت علی‌آبادی[۳]

۱. دانشجوی دکتری 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: mhasani81@yahoo.com; mhasani@iau.ac.ir
۳. استاد گروه مهندسی شیمی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران. رایانامه: mkhaliabadi@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۱۱/۲٦
تاریخ ویرایش: ۱٤۰٤/۰۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱٤۰٤/۰۲/۰۷

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

چکیده

سابقه و هدف: پروتئین‌های هیدرولیزشده به‌دست آمده از محصولات جانبی شیلات، به‌دلیل داشتن پپتیدهای زیست‌فعال، دارای عملکردهای فیزیولوژیک متعددی هستند و به جهت داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی 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 هیدرولیزشده از جمله درجه هیدرولیز، فعالیت و پایداری امولسیون و ظرفیت کف‌کنندگی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده بیانگر پایین‌تر بودن توانایی آلکالاز در انجام هیدرولیز پروتئین، نسبت به آنزیم به‌دست آمده از باکتری سالسوس بود. نتایج نشان داد با گذشت زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین (٤۳/۸۰ درصد) مربوط به نمونه هیدرولیزشده با آنزیم حاصل از باکتری در زمان ۳ ساعت و بالاترین مقدار (۳۹/٦۷ درصد) توسط آنزیم آلکالاز، در زمان ۵ ساعت بود. هم‌چنین مشخص شد که نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم باکتری در طی زمان، تشکیل کف بیش‌تری نسبت به نمونه‌های هیدولیزشده توسط آلکالاز داشتند. بالاترین میزان کف‌کنندگی در نمونه‌های هیدرولیزشده 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 هیدرولیزشده 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.

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

استناد: خلعتبری، شیما، حسنی، مریم، خوشوقت علی‌آبادی، مرتضی (۱۴۰۴). بررسی کارایی آنزیم استخراجی از باکتری باسیلوس سالسوس به‌عنوان جایگزین آلکالاز در هیدرولیز پروتئین ضایعات میگو. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۴ (۴)، ۵۸-۳۹.
Doi: 10.22069/japu.2025.23325.1929

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

منابع دریایی به دلیل دارا بودن ویتامین‌های A و D و هم‌چنین اسیدهای چرب ضروری چند غیراشباع (به ویژه امگا ٣ مانند DHA[1] و EPA[2] و امگا ٦) یکی از بهترین منابع غذایی و دارویی به شمار می‌رود (١). ساختار اسید چرب این روغن و خواص دارویی آن در کاهش فشار خون، افزایش قدرت حافظه، تقویت سیستم ایمنی، جلوگیری از آلزایمر و شب‌کوری، درمان انواع سرطان و بیماری‌های قلبی، پوستی و چشم مؤثر می‌باشد. با وجود این مزایا، عمل‌آوری 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 غیراشباع، هم‌چنین ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشند (٢). از این‌رو، تکنیک‌های فرآوری ضایعات آبزیان باید به گونه‌ای باشد تا ضایعات را به محصولاتی با ارزش افزوده تبدیل کند. میگو یکی از سخت‌پوستان اصلی پرورشی در ایران است که ضایعات قابل‌توجهی را پس از فراوری، به‌جای می‌گذارد (٣). پپتیدهای ضد میکروبی جدا شده از منابع دریایی می‌توانند به عنوان مواد تشکیل‌دهنده در فرمولاسیون مواد غذایی برای ارتقاء سطح سلامت مصرف‌کننده و بهبود عمر مفید محصولات غذایی و به صورت آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی در صنعت دارو استفاده شود (٤).

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 موفقیت‌آمیز بوده است (٥، ٦)، هیدرولیز اسیدی باعث تخریب تریپتوفان شده و بعد از خنثی‌سازی کلرید سدیم تولید می‌شود. هیدرولیز با مواد قلیایی هم تولید اسید آمینه لیزین وآلانین می‌کند، که می‌تواند اثرات سمی به دنبال داشته باشد. در بین روش‌های مختلف، هیدرولیز آنزیمی به‌عنوان روش مؤثر 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 مؤثر می‌باشند، کنترل شرایط هیدرولیز دشوار است. از این‌رو پپتیدهایی که به‌دست می‌آیند ممکن است حاوی خواص موردنظر نباشند. اما هیدرولیز با افزودن آنزیم در شرایط کنترل شده (مثل کنترل دما، pH و ...) می‌تواند زمینه را برای تولید پپتیدهایی با خواص زیست‌فعال متفاوت فراهم کند (٧). هیدرولیز با افزودن آنزیم در شرایط کنترل شده (کنترل دما، pH و ...) می‌تواند زمینه را برای تولید پپتیدهایی با خواص زیست‌فعال متفاوت فراهم کند و نکته‌ای که باید در این روش در نظر داشت این است که آنزیم‌هایی که بدین‌منظور استفاده می‌شوند، باید حداقل یک ویژگی داشته باشند و آن هم قابلیت استفاده در صنایع غذایی است و اگر آنزیم از منابع میکروبی به‌دست می‌آید، میکروارگانیسم تولیدکننده آنزیم نباید بیماری‌زا باشد (٨). به‌طورکلی، 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 (٩). اثر آنزیم در خصوصیات کاربردی پپتید مهم است زیرا تأثیر زیادی بر روی سایز مولکول‌ها و هیدروفوبیتی هیدرولیز شده‌ها دارد، بنابراین پپتیدهای به‌دست آمده پروفایل مولکولی متفاوت و سطح انرژی متفاوت دارند و بسته به آنزیم به‌کار برده شده این تنوع با خصوصیات کاربردی ارتباط دارد (١٠). 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

1- Docosahexaenoic acid
2- Eicosapentaenoic acid

حیوانی و گیاهی ارجحیت داشته و اکثر پروتئازهای موجود منشأ میکروبی دارند (۱۱). پروتئین هیدرولیزه از آبزیان در طیف وسیعی از pHهای مختلف دارای حلالیت مناسبی می‌باشد و معمولاً حرارت زیادی را بدون ایجاد رسوب تحمل می‌کند. به علاوه سبب بهبود خواص بافت، امولسیون‌کنندگی، کف‌کنندگی، ظرفیت نگهداری آب و پایداری فراورده‌های غذایی می‌گردند (۱۲). هم‌چنین پروتئین‌های هیدرولیزه ویژگی‌های عملکردی را نشان می‌دهند و هر ویژگی عملکردی به ترکیب، توالی اسید آمینه و اندازه پروتئین هیدرولیزشده بستگی دارد (۷). اغلب پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی که تاکنون شناسایی شده‌اند کوتاه زنجیر و حاوی آمینواسیدهای هیدروفوب در توالی خود می‌باشند. آن‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای 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 به‌دست آمده است (۱٤). آنزیم آلکالاز نیز در میان سایر آنزیم‌ها، قابلیت بسیار بالایی در هضم منابع پروتئینی از خود نشان داده است (۱۵). آلکالاز پروتئاز میکروبی قلیایی است که از باکتری باسیلوس لیکنی‌فورمیس[1] تولید می‌شود (۱٦). اما به‌دلیل هزینه‌بر بودن تهیه آلکالاز و کمبود این آنزیم به‌دلیل تحریم‌ها محدودیت‌هایی در زمینه استفاده از این آنزیم ایجاد شده‌است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف استخراج آنزیم از باکتری باسیلوس سالسوس و مقایسه درجه هیدرولیز و خصوصیات عملکردی پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از آن با آنزیم آلکالاز تجاری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) از بندر بوشهر در فصل تابستان خریداری شد. آنزیم آلکالاز (فعالیت ۲/٤ واحد آنسون بر گرم) گرفته شده از باکتری باسیلوس لیکنی‌فورمیس از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) خریداری شد. باکتری باسیلوس سالسوس[2] (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 هیدرولیزشده 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 به‌مدت ۲٤ ساعت فریز درای شدند. جهت هیدرولیز پروتئین‌های موجود در ضایعات میگو از آنزیم آلکالاز و آنزیم پروتاز استخراج شده از باکتری باسیلوس سالسوس استفاده شد. به ۰/۱ گرم از آنزیم آلکالاز، ۱۰ سی‌سی بافر فسفات (pH=۸/۵) اضافه گردید. با توجه به این نکته که بهترین عملکرد آنزیم آلکالاز در pH=۸/۵ و بهترین دمای موردنظر بین ۵۰ تا ٦۰ درجه سلسیوس است، جهت بررسی شرایط بهینه عملکرد آنزیم از این محدوده دمایی و pH موردنظر استفاده شد (۱۷). برای رسیدن به مقدار مناسب آنزیم آلکالاز 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. ٦۰ میلی‌لیتر آب مقطر با نسبت وزنی : حجمی ۳:۱ (نمونه فریزدرای شده : آب مقطر) نیز به آن اضافه گردید. مخلوط در ابتدا به‌منظور حذف اثر آنزیم‌های داخلی امعا و

1- *Bacillus licheniformis*

2- *Bacillus salsus*

احشای میگو، در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب و بر روی استیرر قرار داده شد. سپس pH مخلوط با استفاده از محلول سود ۱ نرمال به ۸/۵ رسانده شد. به‌منظور تعیین مقدار مناسب آنزیم آلکالاز در هیدرولیز آنزیمی، در این مرحله مقادیر متفاوتی از آنزیم آلکالاز (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر) به هر نمونه اضافه شد (۱۸). نمونه‌ها در شیکر انکوباتور (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و با دور ثابت ۲۰۰ rpm و به‌مدت 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 فالکون با حجم ۵۰ میلی‌لیتر ریخته شدند و با استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار (مدل Hermle Labrotechnic GmbH z206a، ساخت آلمان) در دمای ٤ درجه سلسیوس با rpm ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی آن جمع‌آوری 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، ٤۰، ۵۰، ۵۵ و ٦۰ 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 به‌دلیل 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. ٦۰ میلی‌لیتر 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 به‌منظور 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. نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت بر روی حمام آب و در دمای ٤۰ درجه سلسیوس بر روی استیرر قرار داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها با دور ۳۰۰۰ rpm 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 ۱، ۳ 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 (١٤).

اندازه‌گیری درجه هیدرولیزاسیون: میزان درجه هیدرولیزاسیون (DH)[1] در نمونه با تری‌کلرو استیک اسید (TCA)[2] ۱۰ درصد حجمی- حجمی طبق روش اویسی‌پور و همکاران (۲۰۱۳) انجام گرفت. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور در ساعات صفر، ۱، ۳ و ۵ ساعت، ۷۵۰ میکرولیتر

1- Degree of Hydrolysis
2- Trichloroacetic Acid

از فاز محلول حاوی پروتئین و ۷۵۰ میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد با سمپلر برداشته شد و در ماکروتیوپ ریخته و پس از هم زدن به‌مدت ۵ دقیقه، با دور ۵۰۰۰ rpm و زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در واقع طی این عمل پروتئین‌های شکسته شده از پروتئین‌های سالم جدا می‌شوند. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول به روش بیورت اندازه‌گیری گردید. میزان درجه هیدرولیز از طریق رابطه زیر محاسبه شد (۲۲).

$$DH\% = \frac{10\%\ TCA-soluble\ N\ in\ sample}{Total\ N\ in\ sample} \times 100 \quad (۱)$$

اندازه‌گیری پروتئین محلول کل: برای تعیین غلظت پروتئین محلول از روش بیورت استفاده شد. پس از سانتریفیوژ، از مایع رویی برای اندازه‌گیری استفاده شد. آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵٤۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/vis خوانده شد (۲۳).

فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI)[1] و شاخص پایداری امولسیون (ESI)[2]: ویژگی‌های امولسیفیه‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده برطبق روش تیلانسیلاکول و همکاران (۲۰۰۷) تعیین گردید. ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان با ۳۰ میلی‌لیتر پروتئین هیدرولیزشده 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 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 امولسیون‌کنندگی (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI) با استفاده از روابط زیر محاسبه می‌شوند (۲٤).

(۲)

ظرفیت امولسیون‌کنندگی = (غلظت پروتئین × ۰/۲۵)/ (میزان جذب× ۲/۳۰۳×۲)

(۳)

پایداری امولسیون = (تغییرات جذب) / (تغییرات زمان) × میزان جذب در زمان صفر

(٤)

تغییرات جذب = میزان جذب در زمان صفر – میزان جذب در زمان ۱۰ دقیقه

(۵)

تغییرات زمان = ۱۰ دقیقه

ظرفیت کف‌کنندگی (FC)[3] و پایداری کف‌کنندگی (FS)[4] پروتئین هیدرولیزشده: ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده بر طبق روش تیلانسیلاکول و همکاران (۲۰۰۷) تعیین گردید. ۲۰ میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیزشده با غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد تهیه شد و با سرعت ۱٦۰۰۰ 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 کف‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده (درصد) در غلظت‌های مختلف تعیین گردید و هم‌چنین برای تعیین پایداری کف‌کنندگی (درصد) با غلظت ۲ درصد پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌های ۰، ۲، ۱۰، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ دقیقه حجم کل کف تولیدی اندازه‌گیری شد. ظرفیت کف‌کنندگی (FC) بر طبق رابطه زیر محاسبه گردید (۲٤).

1- Emulsion Activity Index
2- Emulsion Stability Index
3- Foaming Capacity
4- Foaming Stability

$$FC\ (\%) = [(A - B) / B] \times 100 \qquad (٦)$$

که در آن، 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 رابطه زیر محاسبه گردید:

$$FS\ (\%) = [(A - B) / B] \times 100 \qquad (٧)$$

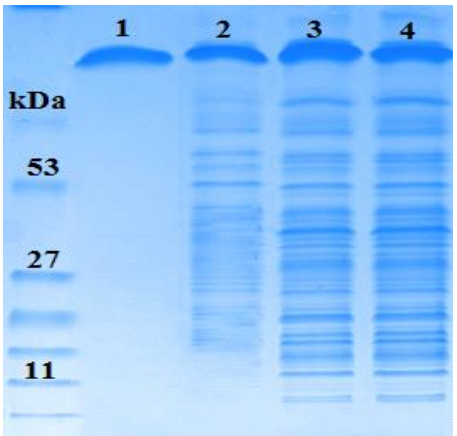
که در آن، A حجم کف پس از نگهداری (میلی‌لیتر) و B حجم کف اولیه (میلی‌لیتر) می‌باشد.

نمونه‌های زده شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای زمان‌های موردنظر نگهداری گردید و سپس حجم کف خوانده شد.

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 یک‌طرفه (One-way ANOVA) و هم‌چنین جهت تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن در سطح ($P\leq ۰/۰۵$) استفاده شد. همه تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲٦ و نمودارهای موجود با Microsoft Excel نسخه ۲۰۲۱ انجام پذیرفت.

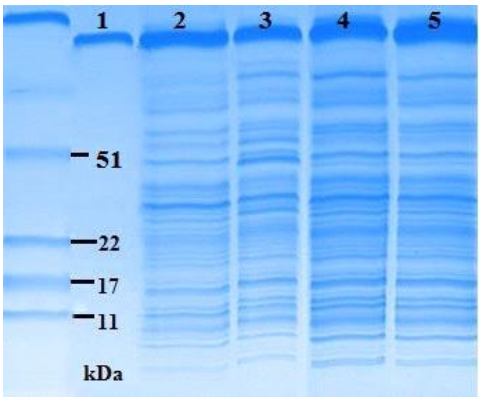
نتایج و بحث

بررسی تجزیه پروتئین: برای هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها، از آنزیم آلکالاز (فعالیت ۲/٤ 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 ٤)، 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 ٤) صورت گرفته است که بیانگر نتایج به‌دست 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.



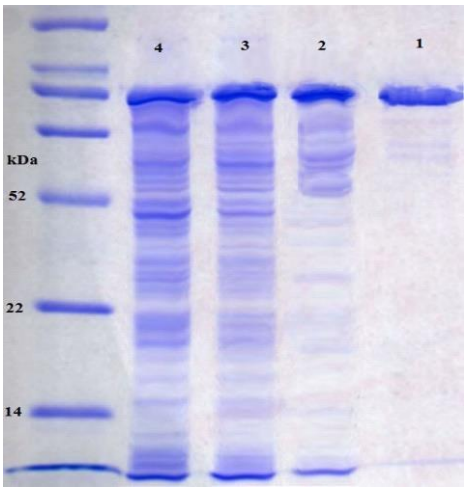
شکل ۱- پروفایل‌های SDS-PAGE پروتئین هیدرولیزشده از ضایعات میگو با استفاده از غلظت‌های مختلف آنزیم آلکالاز (ستون ۱: ۰/۵ میلی‌لیتر آنزیم، ستون ۲: ۱ میلی‌لیتر آنزیم، ستون ۳: ۱/۵ میلی‌لیتر آنزیم و ستون ٤: ۲ میلی‌لیتر آنزیم) در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان ۳ ساعت.

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 هیدرولیزشده از ضایعات میگو توسط آلکالاز در دماهای مختلف (ستون ۱: ۳۰ درجه سلسیوس، ستون ۲: ٤٠ درجه سلسیوس، ستون ۳: ۵۰ درجه سلسیوس، ستون ٤: ۵۵ درجه سلسیوس و ستون ۵: ٦٠ درجه سلسیوس) با غلظت ۲ میلی‌لیتر آنزیم و زمان ۳ ساعت.

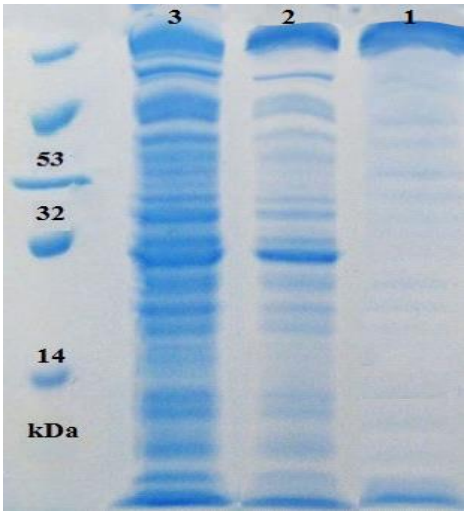
Figure 2. SDS-PAGE profiles of hydrolyzed protein from shrimp waste by Alcalase at different temperatures (Column 1: 30 °C, Column 2: 40 °C, Column 3: 50 °C, Column 4: 55 °C, and Column 5: 60 °C) with an enzyme concentration of 2 mL and a reaction time of 3 hours.



شکل ۳- پروفایل‌های SDS-PAGE پروتئین هیدرولیزشده از ضایعات میگو توسط آلکالاز در زمان‌های مختلف (ستون ۱: صفر، ستون ۲: ۱ ساعت، ستون ۳: ۳ ساعت و ستون ٤: 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 ٤ هیدرولیز پروتئین در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و با استفاده از ۲ میلی‌لیتر آنزیم در مدت زمان‌های ۱، ۳ و ۵ ساعت را نشان می‌دهد.



شکل ٤- پروفایل‌های SDS-PAGE پروتئین هیدرولیزشده از ضایعات میگو توسط آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس در شرایط رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم در زمان‌های مختلف (ستون ١: ١ ساعت پس از هیدرولیز، ستون ٢: ٣ ساعت پس از هیدرولیز و ستون ٣: ٥ ساعت پس از هیدرولیز) در دمای ٥٥ درجه سلسیوس و غلظت ٢ میلی‌لیتر 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.

درجه هیدرولیز و مقادیر پروتئین مستخرج از ضایعات میگو توسط آنزیم آلکالاز و پروتئاز باکتری باسیلوس سالسوس: میزان درجه هیدرولیز (DH%) بیانگر میزان شکافتن پیوندهای پپتیدی طی زمان هیدرولیز می‌باشد و برای مقایسه میان پروتئین‌های هیدرولیزشده استفاده می‌شود. خواص زیستی پروتئین هیدرولیزشده به سوبسترای پروتئینی، ویژگی آنزیم مورداستفاده در هیدرولیز، شرایط هیدرولیز و درجه هیدرولیز وابسته است. پارامترهای مختلفی مانند دما، pH، زمان هیدرولیز، مقدار آنزیم و نسبت آن به سوبسترا و نیز درجه هیدرولیز از جمله عوامل تأثیرگذار بر خصوصیات پروتئین هیدرولیزشده می‌باشند (٢٥). درجه هیدرولیز به‌علت تحت‌تأثیر قرار دادن طول زنجیره پپتیدی، فعالیت ضد اکسیدانی، پروتئین هیدرولیزشده را به‌طور قابل‌توجهی تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (١٦).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر درجه هیدرولیز بعد از ٣ ساعت از فرآیند به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌طوری‌که بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین (٤٣/٨٠ درصد) در این مطالعه مربوط به نمونه هیدرولیزشده با آنزیم حاصل از باکتری باسیلوس سالسوس بعد از گذشت ٣ ساعت از عمل هیدرولیز به‌دست آمد. میزان درجه هیدرولیز در نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم باکتری سالسوس بعد از زمان ٣ ساعت اندکی کاهش یافت، اگرچه در بازه‌های زمانی ٣ تا ٥ ساعت، تفاوت معنی‌داری بین مقدار این شاخص در نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم مورد پژوهش مشاهده نشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان فرض نمود که این امر احتمالاً به‌علت محدودیت سوبسترای در دسترس برای عمل هیدرولیز بود. یافته‌های مطالعات پیشین نیز در تأیید نتایج به‌دست آمده گزارش نمودند که میزان درجه هیدرولیز با طولانی‌شدن زمان واکنش کاهش و سپس ثابت می‌ماند. آن‌ها علت این امر را کاهش غلظت پیوندهای پپتیدی قابل‌دسترس برای آنزیم به‌خاطر عدم وجود سوبسترای لازم جهت هیدرولیز و مهار آنزیم و غیرفعال شدن آن بیان کردند (٢٦).

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 ادامهٔ عمل هیدرولیز به سبب وجود بیش‌تر پیوندهای پپتیدی مقاوم در برابر آنزیم، این روند در آن مشهود است (۲۷). از سوی دیگر، پپتیدهای حاصله نیز می‌توانند با پروتئین‌هایی که هنوز تحت هیدرولیز قرار نگرفته‌اند، برای اتصال آنزیم به جایگاه سوبسترا رقابت کرده و در ادامه باعث کاهش درجه هیدرولیز شوند (۱٦).

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده این نکته است که کارایی هیدرولیز آنزیمی با توجه به شرایط متفاوت فرآیند، نوع آنزیم مورد استفاده و زمان عمل هیدرولیز متغیر است. به‌طور مثال، افزایش زمان فرآیند هیدرولیز سبب فعالیت بیش‌تر آنزیم و افزایش اثر آن بر سوبسترا می‌گردد (۲۸). همان‌طور که مشاهده می‌گردد میزان درجه هیدرولیز در تیمارهای تحت هیدرولیز آنزیمی توسط آلکالاز و آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس بعد از گذشت ۵ ساعت به ترتیب به (۳/۰٦ ± ۳۹/٦۷) و (۲/۷٤ ± ٤۳/۵٦) درصد رسیدند. که با نتایج حاصل از تعیین درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیزشده ماهی تن (٤۷/۵۲ درصد) و ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی توسط آنزیم آلکالاز پس از ٤ ساعت (٤٦/۸ درصد) مشابه بود (۲۹، ۳۰). اثر زمان عمل هیدرولیز با آنزیم‌های پاپائین و پرتامکس بر میزان درجه هیدرولیز و نیز خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده از ماهی تیان توسط پژوهش‌گران مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که با افزایش زمان هیدرولیز از ۲ به ٤ و سپس ٦ ساعت، درجه هیدرولیز نمونه‌ها به ترتیب از ۱۸ به ۲۳ و ۲۸ درصد افزایش یافت. پروتئین هیدرولیزشده 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 حالی‌که استفاده از آنزیم پانکراتین باعث افزایش درجه هیدرولیز از ۳۷ به ٤۷ درصد گردید. پژوهش‌گران 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 سوبسترا و محلول شدن آن‌ها در فاز مایع می‌باشد که به شرایط هیدرولیز، ویژگی‌های ماده مورد هیدرولیز و فعالیت آنزیمی بستگی خواهد داشت (۲٦). نتایج پژوهش بیانگر ارتباط مستقیم بین مقادیر پروتئین حاصل و درجه هیدرولیز و افزایش پروتئین به‌دست آمده با افزایش درجه هیدرولیز بود. آنزیم حاصل از باکتری باسیلوس سالسوس نسبت به آلکالاز از فعالیت پروتئولیتیکی بالاتری برخوردار بوده و پروتئین هیدرولیزشده 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 پژوهش، مقدار بیش‌تری از پروتئین‌های باند شده با سایر ترکیبات تحت‌تأثیر فرآیند هیدرولیز قرار گرفته و در نتیجه مقادیر پروتئین نهایی نیز بیش‌تر بود. می‌توان گزارش نمود با بالاتر بودن میزان پروتئین نهایی، نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم مستخرج از گونه باکتری باسیلوس سالسوس از ارزش غذایی بالایی برخوردار بوده و قابلیت به‌کارگیری 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 به‌طور قابل‌توجهی ($P\leq$۰/۰۵) مقادیر بیش‌تری نسبت به آنزیم‌های نوتراز، پروتامکس و فلاورزایم نشان داد. در این بررسی، هیدرولیز پروتئین ضایعات میگو توسط آنزیم آلکالاز و پروتئاز باکتری باسیلوس سالسوس صورت گرفت که نتایج مطالعات، بیانگر افزایش پیوسته درجه هیدرولیز در طول زمان فرآیند هیدرولیز بود. بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین با ٤۳/۸۰ درصد در این مطالعه مربوط به نمونه هیدرولیزشده با آنزیم حاصل از باکتری باسیلوس سالسوس و در زمان ۳ ساعت به‌دست آمد. اگرچه در بازه‌های زمانی ۳ تا ۵ ساعت، تفاوت معنی‌داری بین مقدار این شاخص در نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم مورد پژوهش مشاهده نشد. نتایج حاصل از بررسی عمل هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز نشان داد که با گذشت زمان درجه هیدرولیز به‌طور پیوسته افزایش می‌یابد و در زمان ۵ ساعت از انجام فرایند به بالاترین مقدار (۳۹/۶۷ درصد) رسید که بیانگر پایین‌تر بودن توانایی آلکالاز در انجام هیدرولیز پروتئین نسبت به آنزیم به‌دست 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*.

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

مقادیر در جدول نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار می‌باشد

حروف کوچک غیرمشابه در جدول نشان‌دهنده معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) بین تیمارها می‌باشد

The values in the table represent the mean ± standard deviation

Non-identical lowercase letters in the table indicate significant differences between treatments ($P\leq0.05$)

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 (به‌جز تیمار تحت آنزیم باکتری در فاصله زمانی ۳ تا ۵ ساعت) در بازه‌های زمانی مورد آزمایش معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) می‌باشد. پروتئین محلول کل در نمونه‌های تحت آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس با ۱/۲۵ ± ۶۵/۸۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به نمونه هیدرولیزشده با آنزیم آلکالاز در زمان یکسان مقادیر بالاتری (۳۷/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را نشان داد (جدول ۲).

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) Total Soluble Protein ($\mu g\ mL^{-1}$)	درجه هیدرولیز (درصد) Degree of Hydrolysis (%)	زمان (ساعت) 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 نشان‌دهنده میانگین± انحراف معیار می‌باشد

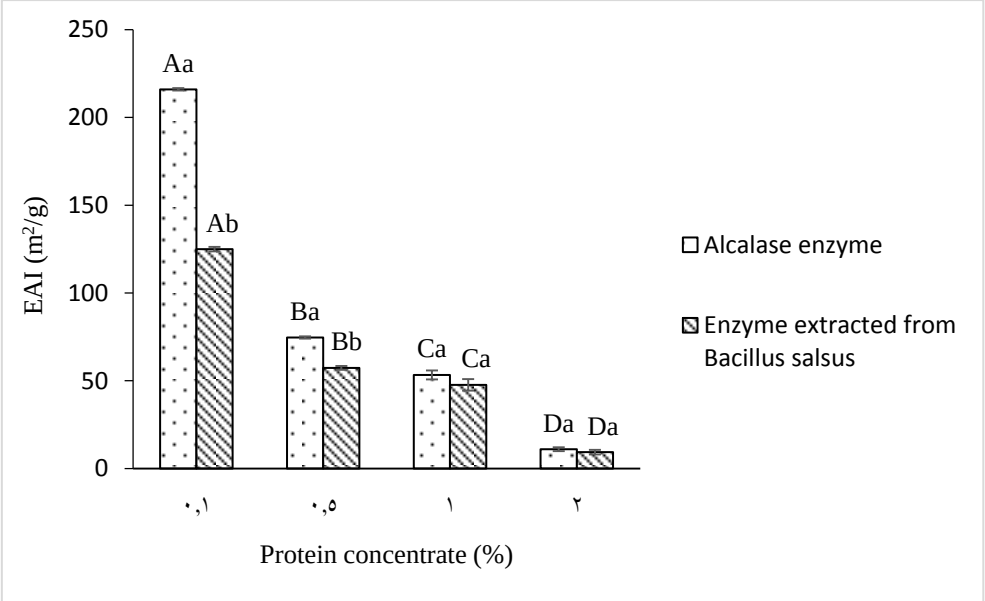
حروف کوچک غیرمشابه در جدول نشان‌دهنده معنی‌داری (P≤۰/۰۵) بین تیمارها می‌باشد

The values in the table represent the mean ± standard deviation

Non-identical lowercase letters in the table indicate significant differences between treatments (P≤0.05)

شاخص فعالیت امولسیون (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI): با توجه به نتایج پژوهش حاضر مشاهده شد که نمونه‌های تولیدی با هر دو نوع آنزیم در غلظت‌های پایین توانایی بیش‌تری در تشکیل امولسیون و فعالیت امولسیون‌کنندگی داشتند. طبق نتایج نمونه‌های تولیدی هر دو آنزیم آلکالاز و آنزیم به‌دست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس در غلظت ۰/۵ درصد بالاترین میزان پایداری امولسیون را نشان دادند. برخی پژوهش‌گران رابطه مستقیمی بین طول زنجیره پپتید و خواص امولسیون‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده بیان کردند. با توجه به یافته‌ها می‌توان دریافت بالا بودن امولسیون‌کنندگی در نمونه‌های هیدرولیزشده با آلکالاز می‌تواند به دلیل ویژگی‌های پپتیدهای تولیدشده باشد. پادیال- دومینگوئز و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که خواص امولسیون‌کنندگی هیدرولیزه‌ها بیش‌تر تحت خصوصیات آمفی‌فیلیک پپتیدها قرار می‌گیرد. آن‌ها گزارش کردند که پپتیدهای بزرگ و بالاتر از ۲ کیلو دالتون، خواص امولسیون‌کنندگی هیدرولیزه‌ها 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 تأثیر معنی‌دار داشتند (P≤۰/۰۵). با افزایش غلظت از ۰/۱ به ۲ درصد میزان EAI کاهش یافت. پروتئین‌ها به‌طور 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 هیدرولیزشده از ۰/۱٤٤ تا ۱۳۰ درصد است که به عوامل مختلفی مانند اندازه مولکولی، توالی اسیدآمینه، نوع آنزیم، pH و درجه هیدرولیز بستگی دارد. به‌طوری‌که با کاهش مقدار درجه هیدرولیز خاصیت امولسیونی بهتر می‌شود. به‌طورکلی با افزایش اندازه پروتئین ارتباط فیلم‌های اطراف قطرات امولسیون ضعیف می‌شود و درنتیجه آن ثبات امولسیونی هم کاهش می‌یابد (۳۲). آن‌ها مشاهده کردند خواص امولسیون‌کنندگی تحت‌تأثیر 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 انعطاف‌پذیری ساختار پروتئین بر ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی تأثیر دارند. میزان شاخص ESI تحت‌تأثیر 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 هیدرولیزشده به هر دو 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 پژوهش‌گران است که جدا از اندازه پپتید، ویژگی‌های آبگریزی یا آبدوستی را در سطوح بین ذرات در امولسیون مؤثر می‌دانند. مطالعات پیشین گزارش کردند که هر چقدر میزان درجه هیدرولیز بالاتر باشد پایداری امولسیون بالاتر است (۳۳، ۳٤).

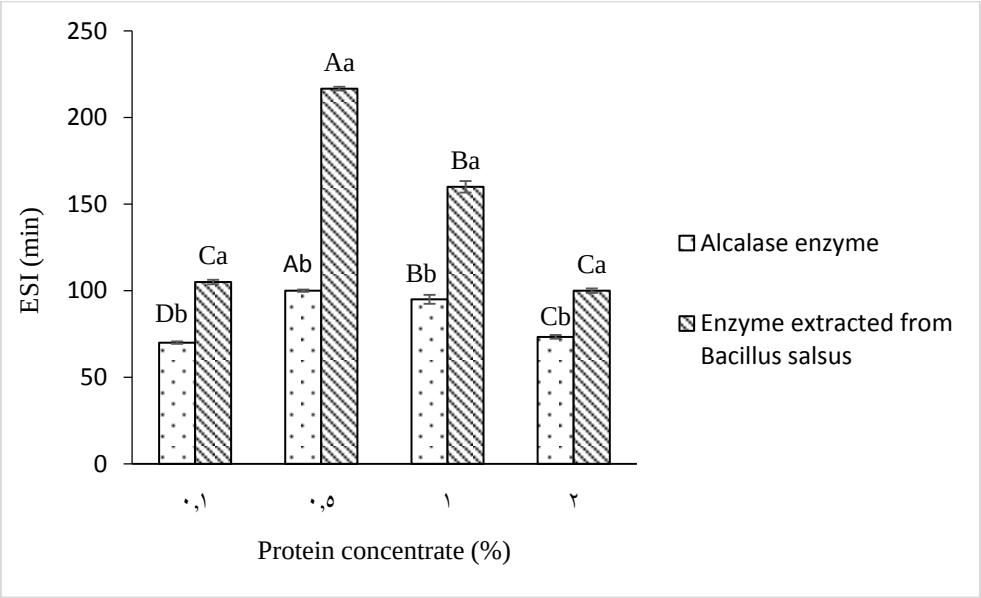


شکل ۵- فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) پروتئین هیدرولیزشده ضایعات میگو تولیدشده با آنزیم آلکالاز و آنزیم به‌دست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس.

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

حروف بزرگ غیرمشابه معنی‌داری (P≤۰/۰۵) بین تیمارها در غلظت‌های مختلف و حروف کوچک غیرمشابه معنی‌داری را در بین تیمارها در هر غلظت نشان می‌دهد.

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



شکل ٦- پایداری امولسیونی (ESI) پروتئین هیدرولیزشده ضایعات میگو تولیدشده با آنزیم آلکالاز و آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس.

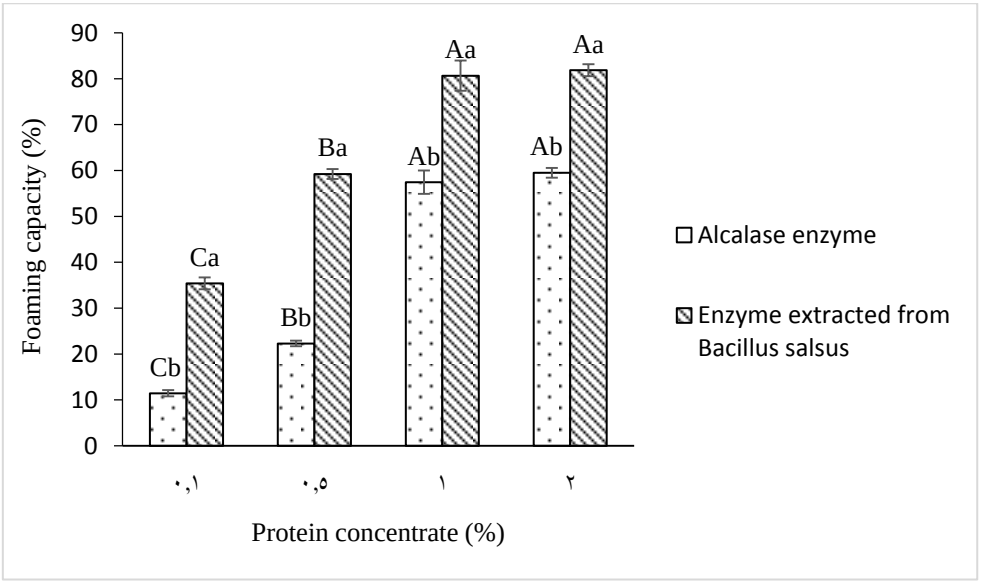
Figure 6. Emulsion stability index (ESI) of hydrolyzed protein shrimp waste produced using alcalase and the enzyme derived from *Bacillus salsus.*

حروف بزرگ غیرمشابه معنی‌داری (P≤٠/٠٥) بین تیمارها در غلظت‌های مختلف و حروف کوچک غیرمشابه معنی‌داری را در بین تیمارها در هر غلظت نشان می‌دهد.

Non-identical uppercase letters indicate significant differences (P≤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 هیدرولیزشده: توانایی تشکیل کف و پایداری کف پروتئین هیدرولیزشده با دو آنزیم آلکالاز و پروتئاز به‌دست 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 ایجادشده تأثیرگذار می‌باشد. خاصیت کف‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده در پژوهش حاضر از حدود ١١/٤٥ تا ٥٩/٥١ درصد در نمونه هیدرولیزشده با آلکالاز و از ٣٥/٤١ تا ٨١/٨٦ درصد در نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم به‌دست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس متغیر است. به‌طوری‌که با افزایش غلظت پروتئین میزان کف‌کنندگی در هر دو تیمار افزایش یافت. مقدار بهینه کف‌کنندگی حدود ٢٠ تا ١٤٠ درصد گزارش شده است (١٦). بالاترین میزان کف‌کنندگی در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم باکتری باسیلوس و غلظت ٢ درصد پروتئین مشاهده شد. طبق نتایج به‌دست آمده در شکل‌های ۷ و ۸ نمونه هیدرولیزشده 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 (٣٥). هم‌چنین نتایج نشان داد پایداری کف‌تولیدشده در طول زمان در هر دو تیمار کاهش یافت و روند کاهش پایداری در تیمار هیدرولیزشده با آلکالاز کندتر بود. نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم آلکالاز در طی زمان پایداری کف بیش‌تری نسبت به نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم به‌دست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس

داشتند. علی‌رغم این‌که نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم به‌دست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس تشکیل کف بالاتری نسبت به آلکالاز داشتند. طبق نتایج به‌دست آمده، نمونه‌های تولیدشده با آلکالاز دارای درجه هیدرولیز پایین‌تری نسبت به نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس داشتند و هم‌چنین دارای پپتیدهای بزرگ‌تر بود. این یافته‌ها همسو با نتایج اینتراسیریساوات 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 (۳٦). 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. به‌طورکلی، تشکیل کف و ویژگی‌های امولسیونی پروتئین هیدرولیزشده 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. پژوهش‌گران 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 هیدرولیزشده رخ می‌دهد. شدت و شرایط هیدرولیز توسط آنزیم‌های آلکالاز و پروتئاز تعیین‌کننده اصلی در میزان پایداری کف هستند (۳۵، ۳۷).

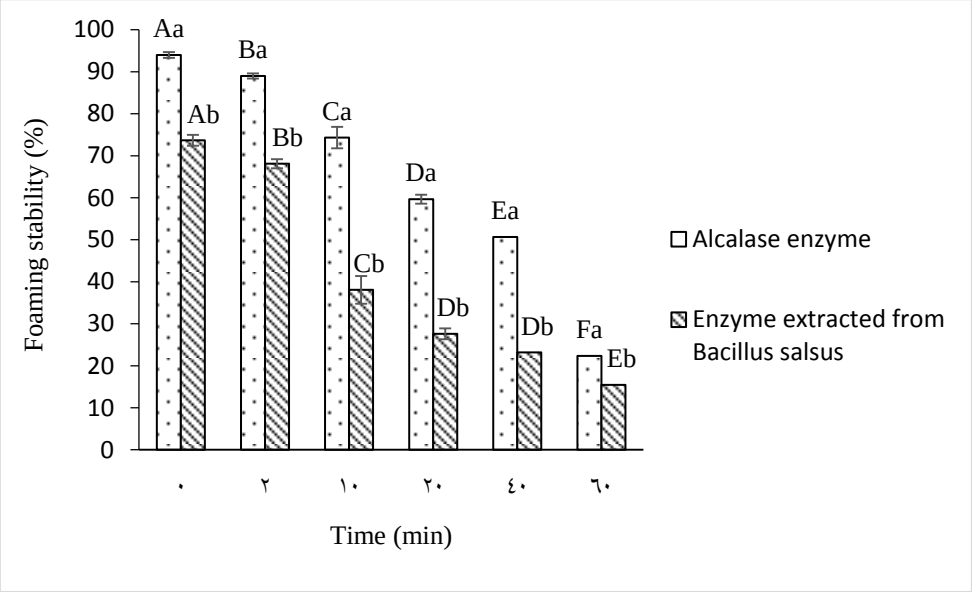


شکل ۷- میزان کف‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده ضایعات میگو تولیدشده با آنزیم آلکالاز و آنزیم به‌دست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس.

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

حروف بزرگ غیرمشابه معنی‌داری (P≤۰/۰۵) بین تیمارها در غلظت‌های مختلف و حروف کوچک غیرمشابه معنی‌داری را در بین تیمارها در هر غلظت نشان می‌دهد.

Non-identical uppercase letters indicate significant differences (P≤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 هیدرولیزشده ضایعات میگو تولیدشده با آنزیم آلکالاز و آنزیم به‌دست 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 غیرمشابه معنی‌داری (P≤۰/۰۵) بین تیمارها در غلظت‌های مختلف و حروف کوچک غیرمشابه معنی‌داری را در بین تیمارها در هر غلظت نشان می‌دهد.

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

نتیجه‌گیری

ضایعات منابع دریایی منبعی ارزشمند از ترکیبات زیست‌فعال 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 زیست‌فعال به کمک هیدرولیز آنزیمی است. نتایج نشان داد که نمونه‌های تولیدشده با آلکالاز دارای درجه هیدرولیز پایین‌تری نسبت به نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم مستخرج از باکتری باسیلوس سالسوس می‌باشند و هم‌چنین مشخص شد نمونه هیدرولیزشده با آنزیم به‌دست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس خاصیت کف‌کنندگی بالاترنسبت به نمونه تیمارشده با آنزیم آلکالاز داشتند که می‌تواند به افزایش حلالیت پروتئین و بالاتر بودن درجه هیدرولیز نمونه نسبت داده شود. علی‌رغم این‌که نمونه هیدرولیزشده 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., Cagalj, 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., Shiroodi, S. G., Modanlow, M., Gholami, S., & Nemati, M. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *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 (*Katsuwonous 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.