استخدام بروتييزات السيرين المستخلصة من القناة الهضمية لسمك الجري في إنتاج متحللات بروتينية من أحشاء السمك نفسه وتوصيفها

خالدة عبد الرحمن شاكر زينة باسم محمد

أستاذ باحث

قسم علوم الأغذية والتقانات الإحيائية – كلية الزراعة – جامعة بغداد

dr_khalida55@yahoo.com

المستخلص

هدفت الدراسة الحالية الى تحضير متحللات بروتينية من الأحشاء الكاملة لسمك الجري ***Siluris glanis*** باستخدام المستخلص الخام لبروتييزات السيرين المستخلصة من القناة الهضمية لذات الأسماك بعد تحديد الظروف المثلى لعملها من الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة المثلى للفعالية والثباتية، ودراسة بعض خصائص تلك المتحللات. شملت طرائق التحضير أربع معاملات منفصلة تمثلت في T1 وT2 وهي هضم العينات السمكية تحت تأثير الأنزيمات الذاتية في وسط المحلول المنظم لخلات الصوديوم pH 4.5 وتركيز 0.2 مولار لمدة 6 و12 ساعة وT3 وT4 أجري الهضم باستخدام المستخلص الخام لبروتييزات السيرين بواقع 120 وحدة إنزيمية وpH 6.5 وتركيز 0.2 مولار لمدة 6 و12 ساعة بالتتابع. أخضعت الروائق الناتجة إلى عملية بسترة على درجة حرارة 80 م° لمدة 10 دقائق وبردت ثم أزيلت الطبقة الدهنية وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6.5 وجففت تحت تفريغ بدرجة حرارة 50 م° ورمزت للمتحللات الناتجة P1 وP2 وP3 وP4. بلغت النسبة المئوية للرطوبة والرماد والدهن والبروتين للمتحللات في المعاملة P1 6 و1.10 و0.40 و92.5% وP2 6.2 و1.45 و0.45 و91.9%، بالتتابع وللمعاملتين P3 وP4 5.4 و1.62 و0.48 و92.5% و5.3 و1.70 و0.5 و92.5% على الترتيب. كانت النسبة المئوية لنتروجين الببتون ونتروجين البروتيوز الكلي ونتروجين البروتيوز الثانوي ونتروجين البروتيوز الابتدائي ونتروجين الأحماض الامينية الحرة للمعاملتين P1 وP2 هي 3.1 و1.95 و0.30 و1.65 و0.4% و4.5 و3.01 و0.36 و2.65 و0.6%، بالتتابع، وللمعاملتين P3 وP4 كانت 5.1 و2.5 و0.37 و2.13 و0.65% و7.3 و3.5 و0.40 و3.1 و0.8%، بالترتيب. بلغت درجة التحلل لهذه المتحللات 35.5 و39 و52.6 و60.1%، بالتتابع. بينت نتائج دراسة الخصائص الوظيفية للمتحللات البروتينية والمتمثلة بقابلية حمل الماء بأنها كانت للمتحللات كافة بواقع 2%، وكانت قيم الذوبانية لكل من P1 وP2 74.6 و85.5%، وللمعاملتين P3 وP4 بلغت 92.2 و93.3% على الترتيب. فيما يخص خاصية الاستحلاب فقد بلغ حجم طبقة المستحلب للمعاملتينP1 وP2 22 و20 مل، في حين كانت للمعاملتين P3 وP4 16 و14 مل، بالتتابع.

الكلمات المفتاحية: متحللات بروتينية، متحللات سمكية انزيمية.

USING SERIEN PROTEASES EXTRACTED FROM THE DIGESTIVE CANAL OF *SILURIS GLANIS* FISH IN PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN HYDROLYSATE FROM *SILURIS GLANIS* VISCERA

Khalida A.R. Shaker Zena B. Mohamed

Prof Research

Dept. of Food Science and Biotechnology- College of Agriculture - University of Baghdad.

dr_khalida55@yahoo.com

ABSTRACT

This study aimed to prepare protein hydrolysate from *Siluris glanis* viscera using the crude extract of serine protease extracted from the same fish digestive duct after identifying the optimum pH and temperature of enzyme extract activity and stability ,then studying some of the obtained hydrolysates properties. The processing methods included four treatments, namely T1, T2 fish samples were digested with 0.2M acetate buffer and pH 4.5 at 6 and 12 hour, and T3, T4 were digested using the crude extract of serine protease 120 unit\ml and pH 6.5, 0.2 M at 6 and 12 hour respectively. The undigested residues were removed by centrifugation and the clarified digests were pasteurized at 80c°/10min, cooled and the solidified fat layer removed then the pH adjusted to 6.5. The obtained hydrolysate was dried under vacuum at 50c°, and four samples were obtained and designated as P1, P2, P3 and P4. The percentages of moisture, ash, fat and protein were for P1 6, 1.10, 0.40, and 92.5%, respectively, and for P2, P3 and P4 were 6.2, 1.45, 0.45, and 91.9 %, 5.4, 1.62, 0.48, and 92.5%, 5.3, 1.70, 0.5, 92,5%, respectively. The percentages of peptone nitrogen, total proteose nitrogen, secondary proteose nitrogen, primary proteose nitrogen and amino acid nitrogen were 3.1, 1.95, 0.30, 1.65 and 0.4% respectively for P1, 4.5, 3.01, 0.36, 2.65 and 0.6 % for P2, 5.1, 2.5, 0.37, 2.13 and 0.65 % for P3, for P4 7.3, 3.5, 0.40, 3.1and 0.8%. The degree of hydrolysis for P1 and P2 were 35.5and 39 % respectively, while for P3, P4 were 52.6 and 60.1% respactively. The results of functional properties showed that the water holding capacity was 2% for P1, P2, P3 and P4 respactively. The solubility values were 74.6, 85.5, 92.2, and 93.3% for P1, P2, P3 and P4, respectively. The emulsion capacity values were 22, 20, 16 and 14 ml for P1, P2, P3 and P4 respectively.

Key words: Protein hydrolysate, fish enzymic hydrolysate.

المقدمة

تعد الأسماك من المصادر الغذائية المهمة للإنسان منذ قديم الزمان وهي مصدر مهم للبروتين الحيواني في اغلب دول العالم وفي قسم منها تؤلف 50% من البروتين الكلي المستهلك، كما أن لحومها تساعد في الحد من أمراض نقص التغذية بسبب محتواها العالي من البروتين ولتنوع الأحماض الامينية الأساسية لها وكذلك الدهون التي تمتاز بمحتواها العالي من الأحماض الدهنية غير المشبعة ،مما يساعد على التقليل من نسبة الكولسترول في الدم فضلا عن كونها مصدراً معتدلاً للطاقة في جسم الإنسان. تحتوي لحوم الأسماك على العناصر المعدنية مثل الكالسيوم والفسفور والصوديوم والمغنيسيوم وغيرها، وعدد من العناصر النادرة مثل اليود والحديد والنحاس والفيتامينات مثل مجموعة B و A و D وتعد الأسماك الغذاء الرئيس لكثير من الشعوب المقيمة على سواحل البحار والمحيطات؛ وان لمخلفاتها أهمية كبيرة إذ بينت العديد من الدراسات إن هذه المخلفات والتي تشمل العظام والأحشاء والجلد والقشور والزعانف تشكل ما يقارب 50% من وزن السمكة وهي مصدر جيد للبروتين بما في ذلك الإنزيمات وكذلك الدهون (13) وركائز جيدة لتخمر حامض اللاكتيك (16)، وما تزال كميات كبيرة من هذه المخلفات تشكل مشكلة بيئية كبيرة إذ يتم التخلص منها من دون بذل أية جهود لاستعادة البروتين (23) أو الاستفادة منها في مجالات مختلفة. لجأ العديد من الباحثين إلى إمكانية استغلال هذه المخلفات وجعلها ذات قيمة حيوية عن طريق تحويلها إلى متحللات بروتينية باستعمال الأنزيمات المحللة (39)، قام Baskar (13) بتحضير متحلل بروتيني من أحشاء سمك الكاتلا أما Nilsang وأخرون (27) فقد تمكنوا من تحضير متحلل بروتيني من أحشاء سمك المحيط الهندي وقام Wasswa (41) بتحضير متحلل بروتيني من جلد كارب الحشائش وذكر Abbas (7) أن البروتين الصالح للأكل في السلور الفضي يشكل 50% أما الباقي فهي مخلفات ولا يمكن استعمال هذه المخلفات كغذاء للأسماك بسبب محتواها العالي من الدهون. لذلك لجأ إلى تحضير متحلل بروتيني من سمك السلور الفضي (*Pangasius ssp*)؛ وفي خصوص الدراسات المحلية قامت Al-Nashi (4) بتصنيع الببتونات من لحم اسماك الجري (*Siluris glanis*) بالهضم الإنزيمي، أما Al-Shammari (2) فقد تمكنت من تحضير مركزات بروتينية من لحم اسماك الخشني (*Liza abu*) بالهضم الأنزيمي ونظرا لكون اسماك الجري (*Siluris glanis*) من الأسماك التجارية المنتشرة في العراق وبلدان أخرى. أجريت دراسات سابقة لفصل بعض الأنزيمات من قناتها الهضمية (5) لذا وقع الاختيار على سمك الجري للاستفادة من مخلفاتها في استخلاص أنزيمات السيرين لما لها من اهمية كبيرة في القناة الهضمية للإنسان والحيوانات إذ إنها من أنزيمات العصارة البنكرياسية وهي تعمل على هضم بروتينات الغذاء بتحليلها مائيا من خلال مهاجمة الأواصر الببتيدية للبروتينات والببتيدات المتعددة وتحويلها الى ببتيدات قصيرة السلسلة وأحماض امينية يسهل امتصاصها في جدار الأمعاء (31) وعليه هدفت هذه الدراسة إلى استخلاص بروتييزات السيرين من القناة الهضمية لسمك الجري وتحديد الظروف المثلى لفعالية وثباتية المستخلص الخام لها واستغلالها في تحويل الأحشاء الداخلية للأسماك الى متحللات بروتينية ودراسة التركيب الكيميائي وبعض الخصائص الوظيفية للمتحللات البروتينية المحضرة بالتحلل الأنزيمي والتحلل الذاتي لغرض الوقوف على مجالات استخدامها.

المواد والطرائق

استخلاص الأنزيم

أجريت عملية استخلاص بروتييزات السيرين باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز (0.2 مولار و6 pH) والمحتوي على 6% ملح كلوريد الصوديوم وعلى درجة حرارة 4 م° وتم تنشيط البروتييزات بخفض الرقم الهيدروجيني الى 1.8 وتركها لمدة 30 دقيقة ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 6.5 وركز المستخلص الخام بالإضافة التدريجية لأملاح كبريتات الأمونيوم بنسبة تشبع 20-60% وقدرت الفعالية التحللية وتركيز البروتين بعد أجراء عملية الديلزة للمستخلص الأنزيمي وكان الرقم الهيدروجيني الأمثل والدرجة الحرارية المثلى لعمل الأنزيم 6.5 و45 م° بالتتابع مع احتفاظ الأنزيم بكامل فعالته في مدى من درجات الحرارة 20-45 م° وتم استعماله في تحضير المتحللات البروتينية.

طريقة إنتاج المتحللات البروتينية

وزعت الأحشاء الكاملة بعد تنظيفها وفرمها في أربعة أوعية وأضيف إلى وعائيين منها محلول خلات الصوديوم الدارئ (برقم هيدروجيني 4.5 وتركيز 0.2 مولار) بنسبة 1: 3 وتركت في حاضنة هزازة لإتمام عملية الهضم بفعل الأنزيمات الذاتية على درجة حرارة 35 م° وأوقف التفاعل في الوعاء الأول بعد 6 ساعات وفي الثاني بعد 12 ساعة بغليهما على درجة حرارة 90 م° لمدة 20 دقيقة وأخضعت الروائق الناتجة إلى عملية بسترة على درجة حرارة 80 م° لمدة 10 دقائق وبردت ثم أزيلت الطبقة الدهنية وعدل الرقم الهيدروجيني الى 6.5 وجففت تحت تفريغ بدرجة حرارة 50 م° ورمز للمتحلل الناتج من النموذج الأول P1 وللثاني P2 أما الوعائيين الآخرين فقد أجريت لهما عملية بسترة بعد إضافة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ (برقم هيدروجيني 6.5 وتركيز 0.2 مولار) بنفس النسبة أعلاه وأضيف إليهما المستخلص الأنزيمي الخام قيد الدراسة بعد تبريدهما الى درجة حرارة 45 م° وبواقع 120 وحدة أنزيمية وأجريت عملية الهضم في حاضنة هزازة وعلى درجة حرارة 45 م°، أوقف التفاعل بنفس الطريقة بعد 6 ساعة ورمز للمتحلل الناتج P3 وترك الأخر لمدة 12ساعة ورمز له P4.

الفحوصات الكيميائية لمفروم أحشاء السمك الخام والمتحللات البروتينية

قدرت الرطوبة والرماد والدهن وفقاً للطرائق المذكورة في A.O.A.C (10) أما البروتين فقد تم تقديره بطريقة Semi-Microkieldahl وحسب ما وصفهPearson (29).

توصيف المتحللات البروتينية

تقدير النتروجين الكلي: تم تقديره حسب طريقة مايكروكلدال الموضحة من قبل Pearson (29).

تقدير نتروجين البيتون: أخذ حجم متساوٍ من محلول 20% و/ح Tanic acid المجهز من شركة BDH البارد 4°م و2% من المتحلل البروتيني و/ح ووضع في أنبوبة اختبار ومزج جيداً ووضعت أنابيب الاختبار في 4°م لمدة 30 دقيقة لإكمال الترسيب ثم نبذت بسرعة 1500g لمدة 20 دقيقة غسل الراسب مرتين باستعمال 5%acid Tanic بارد و/ح ثم ذوب الراسب بحامض الكبريتيك المخفف بنسبة 1:1 وقدر نتروجين البيتون بطريقة كلدال.

تقدير البروتيوز الكلي: رسب المتحلل البروتيني 2% و/ح بإشباعه بكبريتات الخارصين المجهز من شركة Merk ثم رشح الراسب وغسل مرات عدة بمحلول مشبع من كبريتات الخارصين، ذوبت المواد المترسبة بحامض الكبريتيك المخفف بنسبة 1:1 وقدر نتروجين البروتيوز الكلي (المواد المترسبة) بطريقة كلدال المذكورة سابقا.

تقدير البروتيوز الابتدائي: رسب محلول المتحلل البروتيني 2% و/ح مع محلول نصف مشبع لكبريتات الخارصين وكما يأتي: أخذ حجم متساوٍ من كل من المتحلل المتحلل البروتيني 2% و/ح مع محلول نصف مشبع لكبريتات الخارصين ووضع في أنبوبة اختبار ومزج جيداً وترك بحرارة الغرفة إلى اليوم التالي لإكمال الترسيب. غسل الراسب عدة بمحلول نصف مشبع لكبريتات الخارصين مع الطرد المركزي إذ نبذت 1500g لمدة 20 دقيقة ذوبت المواد غير الذائبة بحامض الكبريتيك المخفف بنسبة 1:1 وقدر نتروجين البروتيوز الإبتدائي بطريقة كلدال.

تقدير نتروجين البروتيوز الثانوي: قدر حسابياً بطرح نتروجين البروتيوز الإبتدائي من نتروجين البروتيوز الكلي.

تقدير نتروجين الأحماض الأمينية الحرة: أخذ 10 مل من محلول المتحلل البروتيني ووضع في أنبوبة اختبار، أضيف إليها 20 مل من محلول 5% و/ح مع حامض الفوسفوتنكستيك ببطء مع التحريك المستمر، ثم ترك بحرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، بعدها نبذت بسرعة 1500g لمدة 20 دقيقة أضيفت بضع قطرات من محلول 1% حامض الفوسفوتنكستيك للتأكد من عدم وجود راسب، وكانت النتيجة سالبة، حسب حجم الراشح وقدر نتروجين الأحماض الأمينية الحرة في الراشح.

تقدير النتروجين الأميني: أخذ 25 مل من محلول المتحلل البروتيني 2% و/ح وضبط الرقم الهيدروجيني

إلى 8 باستعمال 0.1 عياري من محلول هيدروكسيد الصوديوم باستعمال (pH-meter) نوع Beckman ثم أضيف له 1.25 مل من الفورمالين المجهز من شركة BDH وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 8 وحسبت قيمة التسحيح الثاني .عومل محلول الكفء بالطريقة المذكورة آنفاً عدا استعمال الماء المقطر بدلاً من الأنموذج كما ذكرها (38) وتدعى هذه الطريقة Formal Titration.

تقدير درجة التحلل للمتحللات البروتينية: قدرت درجة التحلل للمتحللات البروتينية بإتباع طريقة (29) وذلك باستعمال العلاقة الأتية:

درجة التحلل % = (النتروجين الأميني للعينة – النتروجين الأميني لمحلول الكفء / النتروجين الكلي)×100.

تعيين الخواص الوظيفية للمتحللات البروتينية

الذوبانية: تم تقدير النسبة المئوية للذوبانية في المتحللات وذلك بخلط 1 غم من مسحوق المتحلل مع 100 مل من الماء المقطر ثم خلط العينة مع الماء المقطر بالخلاط المغناطيسي لمدة 45 دقيقة في درجة حرارة 30°م ثم رشح المحلول وأخذ 2 مل من الراشح وتم تقدير محتواه من النتروجين الذائب الكلي (PS) بطريقة مايكروكلدال وتم تقدير محتواه من البروتين (Pt) وتقدير النسبة المئوية لكل أنموذج بتقسيم (PS) على النسبة المئوية للبروتين الكلي للعينة: الذوبانية % = Pt/PS × 100.

الاستحلاب: تؤخذ عينة بمقدار 1 غم من المتحلل وتخلط مع 50 مل ماء مقطر و10 مل زيت الذرة بالخلاط الكهربائي لمدة دقيقتين وتوضع في أسطوانة مدرجة في درجة حرارة 25°م ثم تدوين وقت انكسار المستحلب وتعيين ثباتيتها بعد 24 ساعة.

قابلية حمل الماء: تم قياس حمل الماء للمتحلل حسب الطريقة الموصوفة من قبل Beuchart (11) وذلك بأخذ 1 غم من عينة مسحوق المتحلل مع 100 مل من الماء المقطر وقياس الحجم بالأسطوانة المدرجة ثم تم إجراء عملية نبذ مركزي بسرعة (1085 xg) لمدة 5 دقائق وبعدها تم قياس حجم المحلول مرة أخرى وتسجيل الفرق بين القراءتين وحساب نسبة الماء الممتصة لكل معاملة.

النتائج والمناقشة

اوضحت نتائج التحلل الكيمياوي لأحشاء سمك الجري الطازجة ان نسبة الرطوبة كانت 76.4% وهذه القيمة تتفق مع نتائج الدراسات السابقة كدراسة (37) الذي وجد أن نسبة الرطوبة لأحشاء سمك الكود تتراوح بين 70-82%، ومقاربة لما توصل اليه (30) اذ وجد ان نسبة الرطوبة لأحشاء الاسقمري واحشاء سمك السلمون تتراوح بين 63.5-81.2%، بينما كانت نسبة البروتين 21%، وهذه القيمة جاءت مقاربة لدراسة Stein (37) اذ وجد ان نسبة البروتين في احشاء سمك الكود تتراوح بين 15-24%، في حين بلغت نسبة الدهن 1.8% وهذه القيمة جاءت مقاربة لدراسة Stein (37) اذ وجد أن نسبة الدهن في أحشاء سمك الكود تتراوح بين 1-2%، ووجد Peter (30) ان نسبة الدهن لأحشاء سمك الأسقمري واحشاء سمك السلمون تتراوح بين 2-19.1%، اما نسبة الرماد فقد بلغت 0.80% ولم تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه Peter (30) اذ وجد ان نسبة الرماد في احشاء سمك الاسقمري واحشاء سمك السلمون تتراوح بين1.6-2%، إذ أن التركيب الكيمياوي للأسماك يختلف حسب العمر والجنس والنوع وبقعة الصيد والحالة الفسلجية للحيوان (6). يبين جدول 1 التركيب الكيمياوي للمتحللات البروتينية المحضرة من الأحشاء الكاملة لسمك الجري إذ بلغ المحتوى الرطوبي للمعاملتين P1 و P2 6 و6.2% بالتتابع، و P3 و P4 5.4 و5.3% على الترتيب. اظهرت نتائج التحليل الاحصائي الى ان هناك فروق معنوية على مستوى 0.05 بين P1 و P2 أما بين P3 و P4 فلا توجد فروق معنوية بينهما، ووجد Amiza وأخرون (9) أن المحتوى الرطوبي للمتحللات البروتينية المحضرة من أحشاء سمك الكوبيا تراوح بين 4.83 و5.64 و6.25%، ووجدت Al-Nashi (4) أن المحتوى الرطوبي للببتونات المحضرة من لحم سمك الجري كانت 4.40 و4.30 و4.45%، ويفضل أن يكون المحتوى الرطوبي للمتحللات البروتينية أقل من 8% لغرض إطالة مدة خزنه من دون تعرضه للتلف، ويظهر الجدول ذاته أن محتوى الرماد للمعاملتين P1 و P2 كان 1.29 و1.45%، و P3 و P4 1.62 و1.70% بالتتابع، ويظهر الجدول انه لم يكن هناك فروق معنوية في محتوى الرماد بين كافة المعاملات، وذكر Amiza وأخرون (9) أن محتوى الرماد للمتحللات

البروتينية المحضرة من أحشاء سمك الكوبيا 4.73 ويعود السبب في إنخفاض محتوى الرماد للمتحللات البروتينية قيد الدراسة مقارنة مع متحللات أحشاء سمك الكوبيا إلى إنخفاض محتوى المتحللات قيد الدراسة من كلوريد الصوديوم بسبب إستعمال حامض الفسفوريك لخفض الرقم الهيدروجيني وإستعمال هيدروكسيد الكالسيوم لرفع الرقم الهيدروجيني ومن ثم تكون أملاح فوسفات الكالسيوم قد تم التخلص منها بالترشيح، وجاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لنتائج Al-Nashi (4) إذ وجدت أن محتوى الرماد للببتونات المحضرة من لحم سمك الجري بلغ 1.04 و1.045 و1.29%. أما نسبة الدهن فقد بلغت للمعاملتين P1 و P2 0.41 و0.45% و P3 و P4 0.48 و0.50% على الترتيب ويظهر من الجدول ان هناك فروق معنوية بين P1 و P2 ولم يكن هناك فروق معنوية بين P3 و P4، وجاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما توصل إليه (9) إذ وجد أن نسبة الدهن لمتحللات أحشاء سمك الكوبيا كانت 0.26 و0.39 و0.45%، وأشارت العديد من الدراسات إلى أن نسبة الدهن في المتحللات البروتينية تكون أقل من 0.5%(34,24) .إن نسبة الدهن في المتحللات البروتينية قيد الدراسة تعد واطئة الأمر الذي يساعد على ثباتية المنتجات السمكية وإمكانية خزنها لمدة طويلة وبذلك ظهر أثر عملية قشط الطبقة الدهنية العلوية من المتحللات المائية في امكانية خفض محتوى الدهن في المتحللات الناتجة.

جدول 1. التركيب الكيمياوي للمتحللات البروتينية

النماذج	الرطوبة%	رماد%	دهن%	%TN	بروتين%
P1	6	1.10	0.40	14.8	92.5
P2	6.2	1.45	0.45	14.7	91.9
P3	5.4	1.62	0.48	14.8	92.5
P4	4.50	1.75	0.5	15	93.7
L.S.D.	* 0.637	N.S	0.082 *	1.036 *	7.491 *

يظهر الجدول أيضاً نسبة البروتين للمعاملتين P1 و P2 كانت 92.5 و91.9% وللمتحللات P3 و P4 92.5% بالتتابع، ويظهر الجدول ذاته ان هناك فروق معنوية بين P1 و P2 و P3، اما P3 و P4 فلا توجد فروق معنوية بينهما، وجاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لدراسات العديد من الباحثين (35,34, 28,27,24,13) إذ أشاروا إلى أن محتوى البروتين في المتحللات البروتينية المحضرة من أحشاء السمك تتراوح بين 90.863.4–%.

تقدير نسب النتروجين للمتحللات البروتينية المحضرة

يظهر الجدول 2 قيم نتروجين الببتون، والبروتيوز الكلي، والبروتيوز الابتدائي والبروتيوز الثانوي، ونتروجين الأحماض الأمينية الحرة ونتروجين الأمونيا للمعاملةP1 إذ كانت 3.1 و1.95 و0.30 و1.65 و0.4 و0.63% بالتتابع وP2 زادت وبلغت 4.5 و3.01 و0.36 و2.65 و0.6 و0.74% بالتتابع ويظهر أيضاً أن P4 قد تميز عن P3 بارتفاع هذه القيم إذ بلغت 7.3 و3.5 و0.40 و3.1 و0.8 و0.90% بالتتابع اظهرت نتائج التحليل الاحصائي الى ان هناك فروق معنوية على مستوى 0.05 للنتروجين الببتوني للمتحللات P1 وP2 وP3 وP4، اما نتروجين البروتيوز الكلي نجد ان هناك فروق معنوية بين P1 وP2 وP3 ولم تكن الفروق معنوية بين P2 وP4، ولم تظهر نسب نتروجين البروتيوز الابتدائي اية فروقات معنوية للمعاملات كافة.

جدول2. نسب النتروجين للمتحللات البروتينية المحضرة

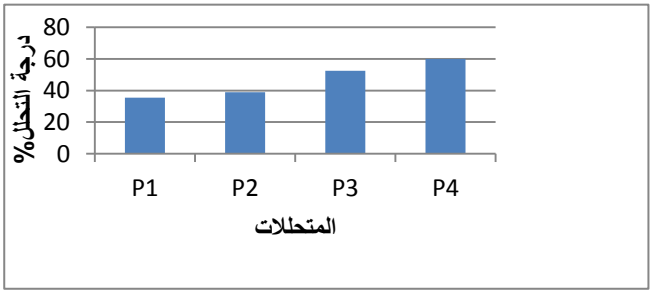
نسب النتروجين	P1	P2	P3	P4	L. S. D
النتروجين الببتوني%	3.1	4.5	5.1	7.3	*2.74
نتروجين ببتوني/TN%	22.7	32.1	34.0	49.7	*9.52
بروتيوز كلي%	1.95	3.01	2.5	3.5	*1.07
بروتيوز كلي/ TN %	14.3	21.5	16.6	23.6	* 5.63
بروتيوز إبتدائي%	0.30	0.36	0.37	0.40	N.S
بروتيوز إبتدائي /TN %	2.2	2.5	2.4	2.7	*0.85
بروتيوز ثانوي%	1.65	2.65	2.13	3.1	*1.05
بروتيوز ثانوي /TN %	12.1	18.9	14.2	20.9	*6.48
نتروجين الأحماض الأمينية الحرة%	0.4	0.6	0.65	0.8	*0.09
نتروجين الأحماض الأمينية الحرة/TN%	2.9	4.2	4.3	5.3	*1.79
نتروجين الأمونيا%	0.63	0.74	0.80	0.90	*0.075
نتروجين الأمونيا / TN%	4.6	5.2	5.3	6.08	*1.07

اما بالنسبة لنتروجين البروتيوز الثانوي نجد ان هناك فروق معنوية بين P1 وP2 وP3 وP4 ولم تكن الفروقات معنويه بينP2 وP3، وكذلك الحال بالنسبة لنتروجين الاحماض الامينية الحرة أما نتروجين الامونيا نجد ان هناك فروق معنوية بين P1 وP2 وP3 وP4، وقد يعود السبب في

اختلاف نسب النتروجين إلى اختلاف المدة الزمنية للتحلل ودرجات التحلل إذ أن درجات التحلل العالية تؤدي إلى زيادة المواد النتروجينية غير البروتينية والتي من ضمنها الأحماض الأمينية الحرة وهذا يتفق مع ما ذكره كل من (32) إذ أن البروتييزات ذات فعل تخصصي تقوم بتحليل الأواصر الببتيدية لجزيئة البروتين محررة الأحماض الأمينية الحرة بالتعاقب إلى وسط التفاعل. جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما توصلت إليه (4) في دراستها على تصنيع الببتونات من لحم أسماك الجري إذ وجدت أن قيم النتروجين الببتوني تراوح بين 0.59-6.40% ونتروجين البروتيوز الكلي 0.37-3.40% ونتروجين البروتيوز الابتدائي 0.25-0.40% ونتروجين الأحماض الأمينية الحرة 0.04-0.89% ونتروجين الأمونيا 0.80-0.90% عند استعمال إنزيمي الببسين والتربسين في تصنيع الببتونات.

تعيين درجة التحلل للمتحللات البروتينية المحضرة

يظهر الشكل 1 إن درجة التحلل للمنتوج P1 كانت 35.5 % وللمنتوج P2 زادت وبلغت 39 % ، وP3 وP4 نجد أن درجة التحلل زادت وبلغت 52.6 و60.1 %على الترتيب، أي أن درجة التحلل للمنتوج P4 كانت أعلى من درجة التحلل للمنتوج P3. ومن خلال النتائج التي تم الحصول عليها نجد أن الاختلاف في درجة التحلل يعود إلى اختلاف المدة الزمنية للتحلل إذ أن درجة التحلل زادت مع تقدم المدة الزمنية لها وإلى اختلاف المعاملة الإنزيمية فعند استعمال طريقة التحلل الذاتي لتحضير المتحللات نجد أن التحلل تم بوساطة الكاثبسينات الداخلية التي تنشط في درجة حرارة 37°م ورقم هيدروجيني 4.5 (8, 20).



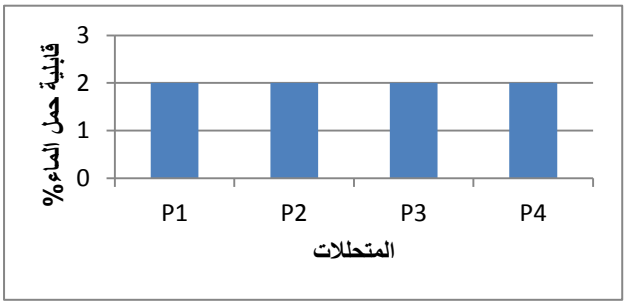
شكل 1. تعيين نسب درجة التحلل للمتحللات البروتينية المحضرة

أما عند استعمال طريقة التحلل الإنزيمي فإن التحلل تم بوساطة المستخلص الخام لبروتييزات السيرين والذي هو خليط من مجموعة أنزيمات وهذا يتفق مع ما بينه (42,15) إذ إن الهضم بأكثر من إنزيم يعمل على زيادة درجة التحلل. ووجد Amiza وأخرون(9) أن درجة التحلل لأحشاء سمك الكوبيا باستعمال إنزيم Alcalase كانت 53 و71 و96% ووجد Bhaskar(13) أن درجة التحلل لأحشاء سمك الكاتلا باستعمال إنزيم Alcalase كانت 49.6%.

الخواص الوظيفية للمتحللات البروتينية قيد الدراسة

قابلية حمل الماء

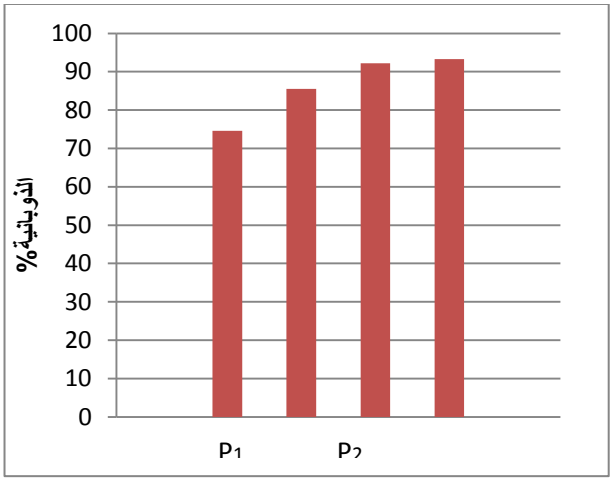
يبين الشكل 2 قابلية حمل الماء للمتحللات البروتينية المحضرة اذ بلغت 2 % لكافة المعاملات ، وقد يعود السبب في قابلية حمل الماء للمتحللات البروتينية قيد الدراسة إلى المحتوى البروتيني في المتحللات الناتجة وقابلية هذه البروتينات على الذوبان؛ فالبروتينات غير الذائبة بصورة كاملة تزيد من قابلية الامتصاص أما البروتينات الذائبة فتعمل على تقليل كمية الماء الممتصة (21)، ويتبين من خلال النتائج التي تم الحصول عليها أن درجة التحلل (DH) لم تؤثر في قابلية حمل الماء للمتحللات قيد الدراسة وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما بينه (14) إذ أوضحوا إن درجة التحلل لم تؤثر في قابلية حمل الماء للمتحللات البروتينية المحضرة من أحشاء سمك القرش ومتحللات جلد كارب الحشائش ومتحللات أحشاء السلور الفضي. وجاءت نتائج الدراسة الحالية مطابقة لما توصل إليه (41) إذ وجد أن قيم قابلية حمل الماء للمتحللات البروتينية المحضرة من جلد كارب الحشائش تراوحت بين 2-4.9% وإنها متقاربة بدرجة كبيرة لقابلية حمل الماء في أنواع المتحللات البروتينية قيد الدراسة. إن قابلية البروتين على مسك وحمل الماء ذات أهمية كبيرة عند استعمالها في المنتجات الغذائية المختلفة، فقد يؤثر في الخواص الحسية للمواد الغذائية إذ تختلف البروتينات بقابليتها على ربط الماء (3).



شكل 2. النسبة المئوية لقابلية حمل الماء للمتحللات البروتينية

ذوبان المتحللات البروتينية

يبين الشكل 3 القابلية الذوبانية للمتحللات البروتينية المحضرة اذ بلغت النسبة المئوية للقابلية الذوبانية للمتحلل P1 و P2 74.6 و 85.5% بالتتابع، أما للمتحلل P3 و P4 كانت بواقع 92.2 و 93.3% على الترتيب، وهذا يتفق مع ما ذكره (26، 17) اذ وجدوا ان استعمال انزيمات التحلل ضروري لتجزئة البروتين الى وحدات صغيرة ومن ثم تصبح المجاميع الأمينية والكاربوكسيلية للأحماض الأمينية متأينة وكذلك تزداد المجاميع المحبة للماء، وإن سبب ارتفاع القابلية الذوبانية للمتحللات البروتينية يعود الى انفتاح البروتين واتاحة المجال أمام المجاميع المحبة للماء للارتباط بالماء والمجاميع الأيونية، ومن ثم زيادة القابلية الذوبانية التي تعد مؤشراً مهماً لتحويرالبروتين. أفادت العديد من الدراسات ان زيادة درجة التحلل(DH) تزيد من نسبة البروتينات الذائبة وبذلك تزداد القابلية الذوبانية للمتحللات ومنها سمك السلور الفضي ومتحللات سمك السالمون (18) ومتحللات سمك التونا الصفراء (22) وجاءت هذه النتائج متفقة لنتائج الدراسة الحالية. إن إذابة البروتين او قابليته على الذوبان هي دليل على مدى أمكانية استعمالة اوعدم إمكانيته للاستعمال في غذاء معين، لذلك فهي تعطي معلومات نافعة في طرائق التصنيع المثالية ، ومن ثم تحديد المعاملات الحرارية التي قد تؤثر في أمكانية استعمال هذا البروتين في الأنظمة الغذائية المختلفة.



شكل 3. القابلية الذوبانية للمتحللات البروتينية

خاصية الاستحلاب

يظهر الجدول 3 ثبات طبقة المستحلب للمتحللات البروتينية قيد الدراسة عند استعمال 1 غم مسحوق+50 مل ماء مقطر +10 مل زيت، إذ بلغت حجم طبقة المستحلب بعد 24 ساعة للمتحلل P1 و P2 22 و 20 مل بالتتابع، و P3 و P4 16 و 14 مل على الترتيب، ويظهر الجدول أن ثباتية المستحلب للمتحللات البروتينية تقل مع زيادة درجة التحلل وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما بينه (36، 41) إذ أوضحوا أن ثباتية المستحلب تقل مع زيادة درجة التحلل للمتحللات البروتينية ويعود السبب في ذلك إلى أن درجة التحلل (DH) تؤدي إلى تكوين ببتيدات أصغر والتي هي أقل فعالية في تحقيق استقرار المستحلبات وإلى انخفاض المجاميع الكارهة للماء والتغيرات التي تطرأ على حجم الببتايد خلال عملية التحلل (36)، وبين Al-Galili (1) أن هناك عوامل عدة تؤثر وبدرجة كبيرة في خاصية الاستحلاب ومنها درجة الحرارة في أثناء تكوين المستحلب ونوع المستحلب وحجم القطرات الدهنية ولزوجة المستحلب فضلاً على حركة اهتزاز المستحلب، ولاحظ Li-Chan (25) أن تأثير درجة الحرارة العالية في سعة استحلاب البروتينات المفصولة من الأسماك ولا حظ إن ارتفاع درجة الحرارة أعلى من 45°م يؤدي إلى انخفاض سعة استحلاب البروتينات المفصولة وبشكل ملحوظ، وأعزي السبب إلى مسخ البروتينات مما يؤدي إلى تغيير طبيعة سطح البروتين من حيث المجاميع الكارهة للماء. نستنتج من نتائج هذا البحث: أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل بروتييزات القناة الهضمية كان بأتجاه الحامضي على عكس تلك المأخوذة من العديد من المصادر والتي تكون عادة قاعدية ، كما أن بروتييزات السيرين تحتفظ بكامل فعاليتها في درجات حرارة20 –45م°.كانت درجات التحلل للمتحللات الأنزيمية اعلى من تلك المتحللات الناتجة من التحلل الذاتي ولنفس الفترات الزمنية ، كان محتوى المتحلل البروتيني الأنزيمي المستحصل من الأحشاء بعد 12 ساعة هضم من النتروجين البتوني أعلى من الأخريات.

جدول 3. ثبات المستحلب للمتحللات البروتينية المحضرة عند استعمال 1 غم مسحوق+50 مل ماء مقطر+10 مل زيت

24	6	5	4	3	2	1	0.5	0	المدة الزمنية للإستحلاب	النماذج
22	22	22	22	22	24	25	26	57	طبقة المستحلب	P_1
35	35	35	35	35	33	32	31	0	طبقة الماء	
20	20	20	20	23	25	27	28	57	طبقة المستحلب	P_2
37	37	37	37	34	32	30	29	0	طبقة الماء	
16	16	16	16	17	19	19	19	57	طبقة المستحلب	P_3
41	41	41	41	40	38	38	38	0	طبقة الماء	
14	14	15	15	15	15	15	15	57	طبقة المستحلب	P_4
43	43	42	42	42	42	42	42	0	طبقة الماء	

المصادر

1. Al-Galili, Z.F. S. Ataallah and S. L. Aziz. 1985.Meat Production and Conservation. Ministry of Higher Education and Scientific Research. College of Agriculture-University of Basra.p.53.(In Arabic)

2. Al-Shammari, R. K.2003. Production of *Liza abu* Fish Protein Concentrates and Assessing their Functional Properties. M.Sc thesis, College of Agriculture-University of Baghdad.p.191.(In Arabic)

3. Al-Tai, M. A .1986. Technology of Meat and Fish. Ministry of Higher Education and Scientific Research. College of Agriculture-University of Basra.p.47. (In Arbic)

4. Al-Nashi, T. A.2000. Manufacturing and IdentiFication of Microbial Peptones for Microbial Using From Cat Fish Flesh *Siluris glanis* by Enzymatic Digestion and Evaluation of it Efficiences. M.Sc thesis, College of Agriculture-University of Baghdad.p.40. (In Arabic)

5. Ali, H. K. 2011 .Extraction,Purification and Characterization of Trypsin From the Alimentary Canal of *Siluris glanis* and Application in Gelatin Manufactre.M.Sc thesis, College of Agriculture-University of Bagdad.p. 113-118.(In Arabic)

6.Kizifte,A.Lakounov,L.Makarova,T.Minder,and V. Eodcevallov.1986. Fishery Products Technology, (translated in to Arabic)Dr.Mazan Jamil Hindi, University of Basra.151:610-617.(In Arabic)

7. Abbas, K.A. S.M. Sapuan, A.S and Mokhtar, 2006. Shelf life Assessment of Malaysian Pangasius Sutchi During Cold Storage. Sadhana 31(5): 635-643.

8. Adler–Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Protein. Elsevier Applied Science Publishers, New York:p.2-29.

9. Amiza, M.A. S.Nurul Ashikin, and A. L. Faazaz. 2011. Optimization of Enzymatic Protein Hydrolysis From Silver Catfish (*Pangasius sp.)* Fram Internatinal Food Research J.18:775-781.

10. A.O.A.C. 1980 Official Methods of Analysis 13th edr. Association of Official Analysis Chemists, Washington D.C.376-384.

11. Beuchart, L. R. 1977. Functional and Electrophoretic Characteristics of Succinylated Peanut Flour Proteins. J. Agric. Food Chem. 25 :258-261.

12. Bhaskar, N. D.Sathisha,A.Sachindra,N.M. Sakhare. P.Z. and N.S. Mahendrakar. 2007a. Effect of Acid Ensiling on the Stability of Visceral Waste Proteases of Indian Major Carp Labeo rohita. J. Aquat. Food Prod. Technol. 16 (1), in press.

13. Bhaskar, N. and N.S. Mahendrakar. 2008. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Catla (*Catla catla*) for Preparing Protein Hydrolysate Using a Commercial Protease. Bioresource Technology99(10): 4105-4111.

14. Diniz, A. M. and A. M. Martin. 1997. Optimization of Nitrogen Recovery in the Enzymatic Hydrolysis of Dogfish (*Squalus acan-*

thias) Protein: Composition of the Hydrolysates. Int. J. of Food Science and Nutrition 48: 191–200.
15. Fodor, P.I. and S. Kuk-Meiri. 1944. Nature of Peptones.Natur.153:250.
16. Gao, M. T. M. Hirata, E. Toorisaka and T. Hano. 2006. Acid Hydrolysis of Fish Wastes for lactic Acid Fermentation. Biores. Technol. 97, 2414–2420.
17. Gauthier, S.F. P. Paquin, Pouliot, Y. and S. Turgeon. 1993. Surface Activity and Related Functional Properties of Peptides Obtained From Whey Proteins, J. Dairy Sci.,76(1):321.
18. Gbogouri, G.A. M. Linder, J. Fanni, and M. Parmentier. 2004 Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon byProducts Hydrolysates. J. of Food Chemistry and Toxicology 69:615-622.
19. Gilbderg A. 2001. Utilisation of Male Arctic Capelin and Atlantic Cod Intestines for Fish Sauce Production-Evaluation of Fermentation Condi tions. Bioresource Technol76:119–23.
20. Huss, H.H. 1995. Quality and Quality Changes in Fresh Fish . FAO Fisheries Technical Paper No 348. Rome, pp195.
21. Jasim, M. A. 1983. Functional Plastein From Fish Waste. Ph.D. Thesis, Longhorough University of Technology. England.3(1):31-42
22. Klompong,V. Benjakul, S. Kantachote, D. and F. Shahidi. 2007. Antioxidative Activity and Functional Properties of Protein Hydrolysate of Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*) as Influenced by the Degree of Hydrolysis and Enzyme Type.J. Food Chemistry 102:120-131.
23. Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco. 2000a. Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (Salmo salar) Muscle Proteins Hydrolysed With Various Alkaline Proteases. J. Agri. Food Chem. 48, 657–666.
24. Kristinsson H.G. and B.A Rasco. 2000b. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. Crit. Rev. Food Sci Nutr. 40(1):43–81.
25. Li-Chan, E. S. Nakai, and D. F. Wood. 1985. Relationship Between Functional (fat binding, emulsifying) and Physicochemical Properties of Muscle Proteins. Effects of Heating, Freezing, PH and Species. J. Food Sc. 50: 1034-1040.
26. Mahmoud, M.I. 1994. Physicochemical & Functional Properties of Protein Hydrolysis in Nutritional Products, Food Technol.4:89-94.
27. Nilsang,S. S. Lertsiri,M.Suphantharika and A. Assavanig. 2005. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Fish Soluble Concentrate by Commercial Protease. Journal of Food Engineering. 70: 571-578.
28. Ovissipour, M. A.M. Abedian, A. Motamedzadegan, B. Rasco ,R. Safari and H.Shahiri. 2009a. The Effect of Enzymatic Hydrolysis Time and Temperature on the Properties of Protein Hydrolysates From the Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Viscera Food Chem 115: 238-242
29. Pearson, D. 1971. The Chemical Analysis of Foods.6th.edr, Chemical Publishing Co., Inc. New York:pp. 604.
30. Peter, J. B. 2003. Properties of Different Fish Processing by Products From Pollock, Cod and Salmon. Journal of Food Processing Preservation 27 : 101-116.
31. Randall, D.;W. Burggren, and K, French. 1997. Eckert Animal Physiology :Mechanisms and Adaptations .4thedr., W.H. Freeman. New York.650-653.
32. Ryan, C. A.and Walker, S. M. 1981. Plant Proteinases in the Biochemistry of Plants In. Abraham Marcus (edr.), vol.6. Academic Press, N.Y.20(1):1-5.
33. See, S. F. L. L. Hoo, and A. S. Babji, 2011.Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Salmon *(Salmo salar)* Skin by Alcalase. International Food Research Journal 18(4): 1359-1365.
34. Shahidi, F. X.Q. Han, and J. Synowiecki. 1995. Production and Characteristics of Protein Hydrolysates From Capelin *(Mallotus villosus*), Food chem., 53:285- 288.
35. Shahidi, F. and A.C. Onodenalore. 1996. Protein Disperse- ons and Hydrolysates From Shark Isurus Oxyrinchus. J.Aquat. Food Prod. Technol., 5: 43.
36. Souissi, N. Bougatef, A. Y. Triki-Ellouz, and M. Nasri. 2007. Biochem Ical and Functional Properties of Sardinella(Sardinella aurita) by Product Hydrolysates.Food Technology and Biotechnology 45(2): 187-194.
37. Stein, I. A. 2005. Proteolytic Conversion of Cod Viscera to Ingredients For Microbial Growth Media.Pross Bioche575:0649-4.

38. Taylor, W. H. 1957. Fromol Titration :An evaluation of its Various Modification. J. Analytical Chem.82:488-497.
39. Venugopal, V. 2006. Spray Dried Protein Powder From Thread Fin Beam:Properties Comparison With FPC type,B;J.Muscle Food,59(2):256.
40. Wasswa,J. J. Tang,H. X. Gu, and X.Q Yuan.2007.Influence of Enzymatic Hydrolysis on the Functional Properties of Protein Hydrolysate From Grass Carp Skin. Food Chemistry 104: 1698-1704.
41. Wasswa ,J. J. Tang and H.G.Xiao.2008 Optmization of the Production of Hydrolysates From Grass Carp(*Ctenopharyngodon idella*) Skin Using Alcalase. J. of Food Biochemistry. 32: 460-473.
42. Winton, A. L. and K. B Winton,. 1947. The Analysis of Foods.John Wiley and Sons, Inc. N. Y.36-115.