بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده کیلکای معمولی (*Clupeonella cultiventris*) با استفاده از آنزیم پرومود

سید روح‌الله جوادیان[۱*]
علیرضا روشن[۲]
محمود رضا اویسی پور[۳]
مجتبی کشاورز[٤]
ماهرخ نعمتی[٥]

۱، ۴. استادیار گروه شیلات، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران
۲. دانش‌آموخته گروه شیلات، قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، مازندران
۳. استادیار دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه ایالتی واشنگتن، واشنگتن، ایالات‌متحده
۵. عضو باشگاه پژوهشگران جوان، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران

***مسئول مکاتبات:**
Ro.javadian@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۴۰۲۳۵۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۱
این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

در مطالعه حاضر پروتئین هیدرولیز شده کیلکای معمولی (*Clupeonella cultiventris*) در سال ۱۳۹۰ با استفاده از آنزیم پرومود تهیه گردید. روش پاسخ سطحی به‌منظور بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده ازلحاظ دما، زمان و میزان آنزیم استفاده شد. اثر ۳ فاکتور دما، زمان و میزان آنزیم بر روی درجه هیدرولیزاسیون، موردبررسی قرار گرفت. بر اساس نمودارهای سه‌بعدی شرایط بهینه ازلحاظ دما و زمان و میزان آنزیم به ترتیب عبارت از دمای ۳۹/۶۴ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۱/۰۲ دقیقه و میزان آنزیم ۱/۳۶ درصد بودند. پروتئین هیدرولیز شده دارای میزان بالایی پروتئین (۷۵/۳۶ درصد) بود.

واژگان کلیدی: کیلکای معمولی، آنزیم پرومود، پروتئین هیدرولیز شده، روش پاسخ سطحی، *Clupeonella Cultiventris*.

مقدمه

مقادیر بسیار فراوانی از ضایعات صنایع عمل‌آوری آبزیان، بدون هیچ تلاشی برای استفاده از آن‌ها، دور ریخته می‌شوند. ولی بسیاری از تولیدکننده‌های فرآورده‌های دریایی به دلایل زیست‌محیطی قادر به دور ریختن ضایعات خود به‌صورت مستقیم به دریا نمی‌باشند و برای پالایش این مواد باید هزینه زیادی را متحمل شوند؛ بنابراین یافتن یک روش مناسب به‌عنوان جایگزینی برای دور ریختن این مواد امری ضروری است (Kristinsson and Rasco, 2000).

بر اساس آمار رسمی سازمان خواروبار جهانی، میزان تولید سالانه آبزیان بالغبر ۱۴۲ میلیون تن می‌باشد (FAO, 2008) که میزان نسبتاً بالای تولید آبزیان و به دنبال آن صنایع عمل‌آوری، منجر به تولید حجم بالایی از مواد غیرقابل استفاده بوده که بدون هیچ توجه زیست‌محیطی دور ریخته می‌شود. عمده‌ترین مواد جانبی صنایع عمل‌آوری آبزیان شامل امعاء و احشاء، پوست، فلس، ستون مهره و استخوان‌های تنه می‌باشد (Benjakul and Morrissey, 1997). این ضایعات صنایع شیلاتی غنی از پروتئین و چربی بوده که باعث تسریع فساد در آن‌ها می‌گردد (Bhaskar *et al.*, 2008). اگر این ترکیبات بیولوژیکی به نحو احسن مورداستفاده قرار بگیرند، از یک سمت باعث کاهش آلودگی زیست‌محیطی ناشی از دور ریختن آن‌ها شده و از سوی دیگر تولید محصولاتی باارزش افزوده بالا را به دنبال خواهند داشت (اویسی پور و قمی ۱۳۸۷).

شاید بتوان اذعان نمود که بهترین راه برای تولید محصولاتی باارزش افزوده بالا از این مواد خام کم‌ارزش، کاربرد آنزیم‌های پروتئاز به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده می‌باشد (Kristinsson and Rasco, 2000). اصلاح آنزیمی پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز که باعث شکسته شدن پروتئین‌ها از نقاط خاص می‌شوند، به‌صورت گسترده در صنایع غذائی کاربرد دارد (Mullally *et al.*, 1994).

پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهیان دارای کاربردهای وسیعی هستند. این مواد به دلیل داشتن پپتیدهای زیست فعال، کندروتین سولفات و خواص ضد اکسایشی، ازجمله مواد مناسب برای درمان سرطان محسوب می‌شوند. از طرف دیگر به دلیل کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، دارای قابلیت هضم بالایی هستند و می‌توانند به‌عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبزیان مورداستفاده قرار گیرند (Alsmeyer *et al.*, 1974). همچنین نقش مؤثر پروتئین‌های هیدرولیز شده به‌عنوان منبع نیتروژن در محیط‌های کشت باکتری به اثبات رسیده است (اویسی پور و قمی، ۱۳۸۷).

تحقیقات بسیاری روی هیدرولیز آنزیمی قسمت‌های مختلف ماهی با استفاده از آنزیم‌های تجاری انجام‌شده است. بسیاری از این تحقیقات، اثر آنزیم‌های مختلف را موردبررسی قرار داده‌اند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های پاپاین با منشاء گیاهی (Hoyle and Merritt 1994)، آنزیم تریپسین و کموتریپسین با منشان جانوری (Shahidi *et al.*, 1995)، آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم و نئو تراز و پروموود با منشاء میکروبی اشاره نمود (Aspmo *et al.*, 2005).

به‌طورکلی، آنزیم‌های با منشاء میکروبی نسبت به سایر آنزیم‌ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می‌توان به پایداری بیشتر در حرارت‌ها و pH های بالا و خصوصیات مناسب پروتئولتیکی اشاره نمود (Diniz and Marti, 1997).

روش پاسخ سطحی به‌منظور بهینه‌سازی عملیات فرآوری محصولات شیلاتی کاربرد دارد (Shahidi *et al.*, 1995). این روش اثر متغیرها را به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی در طول فرآیند مشخص می‌سازد. به‌علاوه به‌منظور آنالیز اثرات متغیرها، این روش یک مدل ریاضی را به وجود می‌آورد که به‌صورت دقیقی شرایط کلی فرآیند را تخمین می‌زند (Ovissipour, 2010).

سالانه حدود ۲۲ هزار تن از ماهی کیلکا صید می‌گردد که بیشترین سهم صید مربوط به گونه کیلکای معمولی می‌باشد (نعمتی، ۱۳۹۰). بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند باعث صرفه‌جویی در انرژی حرارتی، زمان و میزان آنزیمی شود، همچنین با توجه به آمار بالای صید کیلکا که جزء ماهیان کم‌مصرف است، تحقیق حاضر باهدف بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز ماهی کیلکای معمولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella Cultiventris*) در سال ۱۳۹۰ از سواحل جنوبی دریای خزر صید و با استفاده از ظروف یونولیتی به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر منتقل گردید. نمونه‌ها به‌محض رسیدن با دستگاه چرخ‌گوشت صنعتی کاملاً چرخ شده و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و تا شروع آزمایش در همین حالت نگه‌داری شدند. برای انجام آزمایش ابتدا نمونه‌ها انجماد زدایی گردیدند.

سپس از آنزیم پرومود (Promod) با منشأ میکروبی که از شرکت نووازیم (دانمارک) با مشخصات ذیل تهیه‌شده بود، استفاده گردید و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد:

منبع: *Bacillus subtilis* دامنه pH: ۵/۵-۷/۵

پس از خروج نمونه‌ها از یخچال و انجماد زدایی، ۵۰ گرم از نمونه درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری قرار داده و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر نسبت ۱: ۲ به آن اضافه شد و با استفاده از همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس به‌منظور غیرفعال سازی آنزیم‌های داخلی، به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (Guerard *et al.*, 2002; Ovissipour *et al.*, 2009).

pH محلول‌های موردنظر با pH متر اندازه‌گیری و با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH ۷ رسانیده شد. نمونه‌ها در دستگاه انکو باتور متحرک با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد.

در پایان آزمایش به‌منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Guerard *et al.*, 2002; ovissipour *et al.*, 2009; 2010). سپس با استفاده از سانتریفوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع شناور روی آن (سوپرناتنت) جمع‌آوری شد (Krisstinson and Rasco, 2000a).

نوع پروتئین‌ها تعیین گردید (AOAC, 2002). همچنین میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت به روش بیورت مشخص گردید (Layne, 1957). به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی استفاده شد. قرائت در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر انجام شد.

درجه هیدرولیز بر اساس روش Hoyle و Merritt (۱۹۹۴) به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط و سپس با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و درجه هیدرولیز از طریق معادله زیر محاسبه گردید:

(میزان پروتئین حل‌شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد /میزان پروتئین در نمونه)= درجه هیدرولیزاسیون

در تحقیق حاضر آزمایش‌ها بر اساس روش کاملاً تصادفی در قالب طرح چرخشی مرکب مرکزی (CRCD) Central Rotatable Composite Design شامل شش تکرار در نقطه مرکزی، ۲ فاکتوریل و ۲n نقطه محوری و جمعاً ۲۰ تیمار انجام شد.

در تولید پروتئین هیدرولیز شده، میزان فعالیت آنزیمی (درصد میزان پروتئین نمونه اولیه (X1، دما (درجه سانتی‌گراد، X_2) و زمان هیدرولیزاسیون (دقیقه، X_3)، به‌عنوان متغیرهای مستقل انتخاب شدند. متغیرهای مستقل، به‌صورت کدگذاری شده و در سطح واقعی آزمایش، در جدول ۱ ارائه‌شده است.

جدول ۱: محدوده و مقادیر آزمایشی متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella Cultiventris*).

عامل	پایه‌ها				
	+α	۱+	۰	۱-	[۱]-α
میزان آنزیم (درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) (X_1)	۳/۶۸	۳	۲	۱	۰/۳۱
دما (درجه سانتی‌گراد) (X_2)	۶۱/۸۱	۵۵	۴۵	۳۵	۲۸/۱۸
زمان (دقیقه) (X_3)	۴۶/۸۱	۴۰	۳۰	۲۰	۱۳/۱۸

[۱] α=۰/۶۸

دامنه‌های ارائه‌شده در جدول بر اساس پیش تیمارهای آزمایشی انجام‌شده توسط گروه تحقیقاتی این پژوهش و نیز اطلاعات ارائه‌شده توسط Ovissipour و همکاران (2009) تعیین شد.

درجه هیدرولیزاسیون به‌عنوان سطح پاسخ متغیرها، در نظر گرفته شد. پاسخ سیستم آزمایشی، بر اساس معادله زیر انجام گرفت:

$$Y = B_{\circ} + \sum_{i=1}^{3} B_i X_i + \sum_{i=1}^{3} B_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} B_{ij} X_i X_j$$

آزمایشات بهینه‌سازی با استفاده از روش پاسخ سطحی (RSM) و طرح فاکتوریل انجام‌گرفته و برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار آماری SAS استفاده گردید. به‌منظور رسم نمودارهای مربوط بهینه‌سازی از نرم‌افزارهای MATLAB استفاده و میزان معنی‌دار بودن تیمارها در سطح اعتماد ۹۵ درصد سنجیده شد.

نتایج

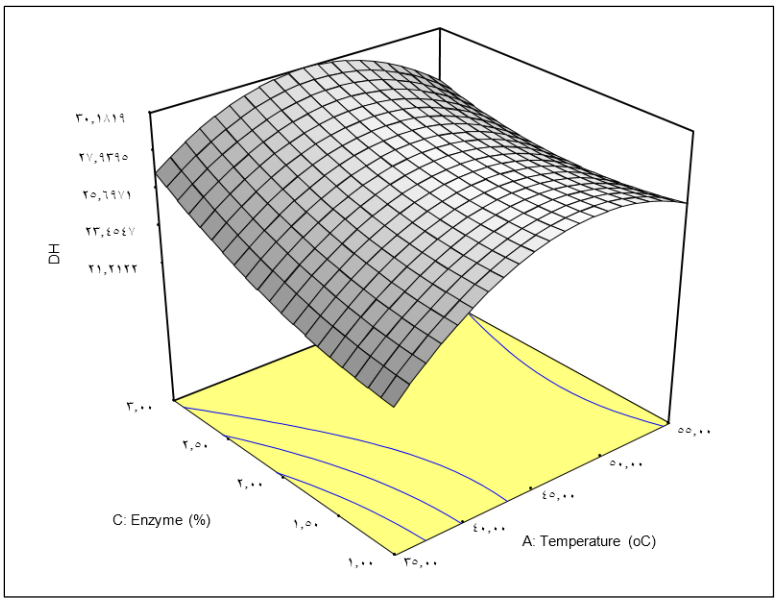
میزان پروتئین اولیه در ماده خام اولیه ۱۵/۵۴ درصد بوده و در پروتئین هیدرولیز شده میزان پروتئین ۷۸/۹۱ درصد بوده است. در تحقیق حاضر جهت بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده اثر شرایط (نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و زمان) به‌عنوان فاکتور بحرانی در تولید پروتئین هیدورلیز شده موردبررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های انجام‌گرفته به‌صورت مقادیر پاسخ در طرح مرکب مرکزی در جدول ۳ نشان داده‌شده است.

جدول ۳: طرح مرکب مرکزی و پاسخ‌های متغیر وابسته (درجه هیدرولیز) به متغیرهای مستقل.

موارد آزمایش	درجه حرارت	زمان	آنزیم	DH
۱	۳۵	۲۰	۱	۱۵/۱۲
۲	۳۵	۴۰	۱	۲۴/۶۷
۳	۵۵	۲۰	۱	۲۲/۴۲
۴	۵۵	۴۰	۱	۲۵/۸۳
۵	۳۵	۲۰	۳	۲۵/۱۲
۶	۳۵	۴۰	۳	۲۴/۳۴
۷	۵۵	۲۰	۳	۲۵/۲۳
۸	۵۵	۴۰	۳	۲۳/۲۹
۹	۴۵	۳۰	۲	۲۶/۳۱
۱۰	۴۵	۳۰	۲	۲۷/۳۴
۱۱	۴۵	۳۰	۲	۲۷/۲
۱۲	۴۵	۳۰	۲	۲۷/۵۷
۱۳	۲۸,۱۸	۳۰	۲	۱۴/۶۱
۱۴	۶۱,۸۱	۳۰	۲	۲۰/۴۱
۱۵	۴۵	۱۳,۱۸	۲	۱۶/۷۳
۱۶	۴۵	۴۶,۸۱	۲	۲۴/۱۲
۱۷	۴۵	۳۰	۳,۶۸	۳۳/۴۲

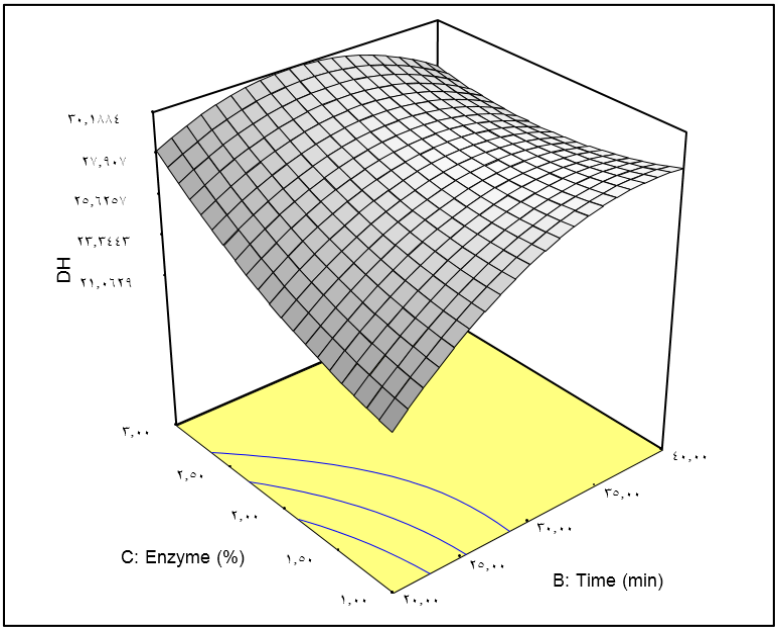
۱۸	۴۵	۳۰	۰/۳۱	۲۶/۵۲
۱۹	۴۵	۳۰	۲	۲۹/۴۶
۲۰	۴۵	۳۰	۲	۲۷/۷۴

اثر متقابل میزان آنزیم و دمای هیدرولیزاسیون در شکل ۱ ارائه‌شده است و با توجه به شکل با افزایش میزان آنزیم درجه هیدرولیزاسیون افزایش می‌یابد اما با افزایش میزان آنزیم از ۱/۳۶ درصد اثر آنزیم روی درجه هیدرولیزاسیون کاهش را نشان می‌دهد. همچنین با افزایش درجه حرارت، درجه هیدرولیزاسیون افزایش می‌یابد اما بعد از درجه حرارت ۳۹/۶۴ شدت نرخ درجه هیدرولیزاسیون کاهش می‌یافته و تقریباً ثابت می شود.



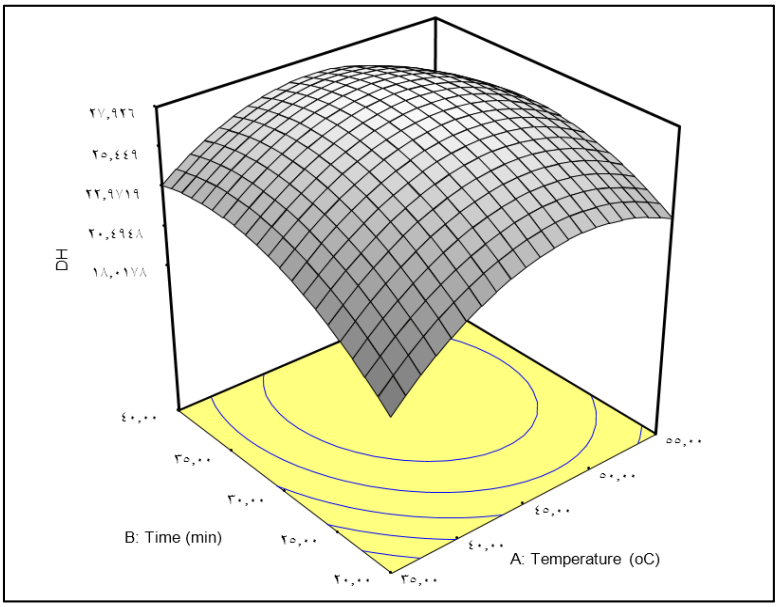
شکل ۱: اثر متقابل میزان آنزیم و دمای هیدرولیزاسیون بر روی درجه هیدرولیزاسیون.

اثر متقابل زمان هیدرولیزاسیون و میزان آنزیم در شکل ۲ ارائه‌شده است. بر اساس شکل با افزایش مدت‌زمان هیدرولیزاسیون شدت نرخ هیدرولیز کاهش‌یافته و تقریباً ثابت می‌شود.



شکل ۲: اثر متقابل میزان آنزیم و زمان هیدرولیزاسیون بر روی درجه هیدرولیزاسیون.

اثر متقابل دما و زمان هیدرولیزاسیون در شکل ۳ ارائه‌شده است. با توجه به شکل با افزایش دما درجه هیدرولیزاسیون تا درجه حرارت ۴۰ درجه شدت هیدرولیزاسیون افزایش‌یافته و سپس شدت نرخ درجه هیدرولیزاسیون کاهش می‌یافته و تقریباً ثابت می‌شود.



شکل ۳: اثر متقابل دما و زمان‌بر درجه هیدرولیزاسیون.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مربوط به میزان پروتئین حاکی از بالا بودن پروتئین در پروتئین هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه بود (۷۸/۹۱ درصد) و در نتایج سایر محققین میزان پروتئین ۶۳/۴ تا ۹۰/۸ درصد بود (Bhaskar *et al.*, 2008; Kristinsson and Rasco 2000; Soussi *et al.*, 2007; Ovissipour *et al.*, 2009; Shahidi *et al.*, 1995)

با توجه به شکل ۱ بالاترین درجه هیدرولیزاسیون در درجه حرارت ۳۹/۶۴ درجه سانتی‌گراد و میزان آنزیم از ۱/۳۶ درصد مشاهده شد. بنابراین دمای ۳۹/۶۴ سانتی‌گراد بهترین درجه حرارت هیدرولیزاسیون می‌باشد. تقی اف و همکاران (۱۳۸۹) طی تحقیقی روی بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پروتئین‌های امعاء و احشاء فیل‌ماهی، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و میزان آنزیم ۱/۵ درصد را بهترین دما و میزان آنزیم برای هیدرولیزاسیون اعلام نمودند.

با توجه به شکل ۲ با افزایش زمان هیدرولیزاسیون شدت نرخ هیدرولیز کاسته می‌شود. علت این حالت را می‌توان چنین توجیه نمود که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، تعداد باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش پیدا می‌کند، همچنین، از میزان فعالیت پروتئولتیکی آنزیم کاسته می‌شود. از طرف دیگر، شکل‌گیری ترکیباتی که ممانعت کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد (اویسی پور و همکاران ۱۳۸۹).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درجه هیدرولیزاسیون تحت تأثیر میزان آنزیم، درجه حرارت و زمان هیدرولیزاسیون می‌باشد. همچنین بر اساس طرح آماری سطح پاسخ و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و MATLAB، شرایط بهینه تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی، شامل دمای ۳۹/۶۴ درجه سانتی‌گراد، زمان هیدرولیزاسیون ۲۱/۰۲ دقیقه و میزان آنزیم (درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) ۱/۳۶ درصد بوده است. همچنین با توجه به نتایج درجه هیدرولیزاسیون در شرایط بهینه ۲۰/۰۲ می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر می‌باشد. مؤلفین از دانشگاه آزاد اسلامی به خاطر حمایت‌های مالی و فنی نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

منابع

اویسی پور، م.، و قمی، م. ر.، ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی در تولید فرآورده‌های دریایی. *انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن.* صفحات ۱۰۴-۳۷.

اویسی پور، م.، عابدیان کناری، ع. م.، معتمد زادگان، ع. و نظری، ر. م.، ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنزیم‌های تجاری. *نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۶* (۱)، صفحات ۷۶-۶۸.

تقی اف، م.، قمی، م.، اویسی پور، م.، ۱۳۸۹. تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء فیل‌ماهی (*Huso huso*) با استفاده از آنزیم آلکالاز. مجله شیلات، سال چهارم، شماره اول، بهار ۸۹. صفحات ۴۵-۳۵.

سازمان شیلات ایران.، ۱۳۸۷. آمار صید آبزیان.

نعمتی، م.، ۱۳۹۰. بررسی خواص پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی زالون (***Alosa caspia***) با استفاده از آنزیم‌های تجاری. *پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی قائم‌شهر.* صفحه ۱۷.

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

Alsmeyer, R. H., Cunningham, A. E. and Happich, M. L., 1974. Equations predicting PER from amino acid analysis. *Food Technology*, 28(7), 34–40.

Aspmo, S. I., Horn, S. J. and Eijsink, V. G. H., 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L*.) viscera. *Process Biochemistry*, 40(5), 1957–1966.

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

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. and 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(10), 410

Diniz, A. M. and 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 Science and Nutrition*. 48: 191–200.

FAO., 2008. *Food and Agricultural Organisation of the United Nations*. Year book of fishery statistics. Rome. 98.

Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 19–20, 489–498.

Hoyle, N. T. and Merritt, J. H., 1994. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. 59, 76–79 & 129.

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

Kristinsson, H. G. and Rasco, B.A., 2000a. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Crit Rev Food Sci Nutr. 40, 43–81.

Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Meth Enzymol. Vol. 3 p. 450. Academic press, Ind., New York.

Mullally M. M., O'Callaghan D. M., FitzGerald R. J., Donnelly W. J. and Dalton J. P., *1994.* Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2973-2981.

Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*. 115. 238–242.

Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A. and Nazari, R. M., 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food and Bioproccess Technology*. 5 (2), 696- 705

Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2007. Biochemical and functional properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*. . 45, 187-194.

Shahidi, F., Han, X. Q. and Syniwiecki, J., 1995. Production and characteristics ofprotein hydrolysates from capelin *(Mallotus villosus). Food Chemistry*, 53, 285–293.