فصلنامه علمی ـ پژوهشی

دورهٔ ۵، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۶۹- ۸۲

# بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از عضلهٔ ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) خلیج‌فارس به روش سطح پاسخ

**علی حمزه[۱]، مسعود رضائی[۲*]، صابرخدابنده[۳]، علی معتمدزادگان[٤]، مهرداد نوروزی نیا[۵]**

۱- دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور،

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

٤- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۵- دانشیار گروه هماتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: ۹۳/۱۲/۱۱ پذیرش: ۹٤/۱۱/۱۲

*نویسنده مسئول مقاله: rezai_ma@modares.ac.ir

**چکیده**

شریط بهینه بر نزیم ا الا جهت تولید پر تئین هید لیزشد عضله ماهي مر ـب ببـر خلیج فا با ستفا فا تو ها ما، نسبت نزیم به سوبستر، مـا pH ۵ سـطح قالب طر مر ب مر ز با لفا بر بر ۲ پاسخ سطح، بر سي شد. مد جمله به ست مد سطح ۹۹/۹۹ صد معني بو ضریب تعیین بر بر ۰/۹۵، نسبت سیگنا به ختلا بر بر ۱۴/۱۶ عد معني فقد تناسب نشا ا ئي خو مد بـر پیشـبیني بو . نهایت شریط بهینه با ستفا نر فز Design Expert به‌صو pH=۸/۱۹، ما ۵۰/۲۳، ما ۱۲۹/۶۲ صد نزیم ۲/۱۵ به ست مد.

**کلید واژگان:** پروتئین هیدرولیزشده، ماهی مرکب ببری، آلکالاز، روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی

**مقدمه**

در سـال ۲۰۱۲ میـزان تولیـد آبزیـان، متشـکل از صـید و آبزی‌پروری، ۱۵۸ میلیون تن بوده کـه از ایـن مقـدار فقـط حدود ۱۳٦/۲ میلیون تن برای مصارف انسانی بود ( FAO,



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

2014). گونه‌هایی که به مصارف انسانی می‌رسند نیز باید عمل‌آوری شوند و عمل‌آوری آبزیان نیز با تولید ضایعاتی همچون پوست، سر، امعا و احشا، اسکلت داخلی و غیره همراه است (Oosterveer, 2008). از طرفی در صید آبزیان به‌ویژه صید صنعتی که با صرف هزینه‌های زیاد امکان‌پذیر است، سهم قابل توجهی از آن را صید ضمنی تشکیل می‌دهد. در نتیجه یکی از مشکلاتی که این صنعت با آن روبه‌رو است وجود صید ضمنی قابل توجه و تولید ضایعات متعدد است. گونه‌های کم‌مصرف و یا ضایعات ممکن است حاوی ترکیبات مغذی و یا زیست فعالی[1] باشند که با تأمین مواد ضروری برای بدن و یا جلوگیری از عوامل بیماری‌زا سبب حفظ سلامتی انسان‌ها شوند. از روش‌های مختلفی برای مصرف گونه‌های کم‌مصرف و ضایعات استفاده می‌شود که از جمله آنها می‌توان به تولید آرد ماهی، ژلاتین، روغن ماهی، کیتین و کیتوزان از ضایعات پوسته‌داران و پروتئین هیدرولیز شده اشاره کرد (Kristinsson, 2006).

پروتئین هیدرولیزشده مجموعه‌ای از پپتیدها (معمولاً با ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه) هستند که در اثر شکستن زنجیره‌های پروتئینی در نتیجه فرایندی تحت عنوان هیدرولیز به‌وجود می‌آیند. هیدرولیز پروتئین اجازه می‌دهد که نیتروژن بیشترمحلول شده و اسیدهای آمینه آزاد تشکیل گردد و در نتیجه یک منبع جدید اسید آمینه با قابلیت دسترسی بیشتر تولید گردد (Chalamaiah et al, 2012).

از روش‌های مختلفی برای شکستن زنجیره‌های پروتئین (هیدرولیز) به‌منظورتولید پروتئین هیدرولیزشده شامل تخمیرمیکروبی، هیدرولیز شیمیایی متشکل از هیدرولیز اسیدی و قلیایی و هیدرولیزآنزیمی استفاده می‌شود. تخمیرمیکروبی در زمینه هیدرولیز پروتئین‌ها کمتر موفقیت‌آمیز بوده است (Hammes et al, 2003; Arihara, 2006). هیدرولیز اسیدی باعث تخریب تریپتوفان شده و پس از خنثی‌سازی کلرید سدیم تولید می‌شود. هیدرولیز با مواد قلیایی هم تولید اسید آمینه لیزوآلانین می‌کند؛ گزارش شده که این اسیدآمینه می‌تواند اثرات سمی داشته باشد(Kristinsson, 2006). در بین روش‌های مختلف، هیدرولیز آنزیمی به‌عنوان روش مؤثر در این زمینه شناخته شده است که البته هیدرولیز آنزیمی هم با دو روش استفاده از آنزیم‌های درونی (اتولیز) و هیدرولیز با افزودن آنزیم تحت شرایط کنترل شده انجام می‌شود. هیدرولیز با آنزیم‌های درونی به‌عنوان روش سنتی هیدرولیز پروتئین‌ها شناخته می‌شود و از آنجایی‌که در این روش عوامل مختلفی همچون زمان (فصل صید)، تغذیه و عوامل محیطی اثرگذار است، کنترل شرایط هیدرولیز دشوار می‌باشد، اما هیدرولیز با افزودن آنزیم در شرایط کنترل شده (مثل کنترل دما، pH و ...) و غیرفعال کردن آنزیم‌های درونی از روش‌های مؤثر و پرکاربرد است (Kristinsson and Rasco, 2000). نکته‌ای که باید در این روش در نظر داشت این است که آنزیم‌هایی که بدین منظور استفاده می‌شوند باید حداقل یک ویژگی داشته باشند و آن هم قابلیت استفاده در صنایع غذایی (Food grade) است و اگر آنزیم از منابع میکروبی به‌دست می‌آید، میکروارگانیسم تولیدکننده آنزیم نباید بیماری‌زا باشد (Bhaskar et al, 2007).

آنزیم‌های میکروبی به‌ویژه آلکالاز (پروتئاز تهیه شده از باکتری *Bacillus licheniformis*) به‌دلیل تولید

1 Bioactive



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

پروتئین با درجه بالای آبکافت درکوتاه ترین زمان و در شرایط متعادل نسبت به آنـزیم هـای خنثـی یـا اسـیدی به‌طورگسترده استفاده می‌شود. در روند تولیـد پـروتئین آبکافت بسته به ویژگی‌های خود آنزیم، شرایط محیطـی و میـزان آبکافـت تنـوع گسـترده‌ای از پپتیـدها بـا وزن مولکولی متفاوت به‌دست خواهد آمد. پروتئین آبکافـت شده به‌دست آمده به‌دلیل وجود پپتیدهای جدید خواص کـاربردی نـوینی خواهـد داشـت (Thiansilakul et al, 2007)

شرایط هیدرولیز بر خواص پروتئین هیدرولیز شـده اثر می‌گذارد، به‌طورکلی به‌نظر می‌رسد که پپتیدهای بـا طول زنجیرۀ کوتاه‌تر نسبت به پروتئین‌هـای بـا زنجیـرۀ بزرگ‌تر و همچنین اسیدهای آمینۀ آزاد خـواص بهتـری دارند اما با این وجود، ساختار، طـول زنجیـره و تـوالی اسید آمینه به عوامل مختلفی نظیر شرایط هیدرولیز، دما، غلظت آنزیم، زمان، pH و مـادۀ زمینـه‌ای بسـتگی دارد (Benjakul et al, 2014).

ماهی مرکب با صید جهانی حدود ۳ میلیون تـن در هر سال از جمله گونه‌هایی است که به میـزان بسـیاری همراه با صید ضمنی به‌دست می‌آیـد (FAO, 2011). در ایران نیـز هـر سـاله حجـم زیـادی از مـاهی مرکـب از آب‌های خلیج‌فارس به‌وسیلۀ صیادان به‌طور مستقیم و یا ضمنی همراه با صید میگو به‌دست می‌آید ولی در کشور علاقه‌ای به مصرف مستقیم این آبزی وجود ندارد.

از این‌رو با توجه به فراوانی و عدم مصارف تغذیه‌ای ماهی مرکب ببری در کشور از یک سو و پتانسیل بالقوه تولید فراورده‌هایی با ارزش افزوده از سوی دیگـر، و از آنجایی کـه تـاکنون مطالعـه‌ای دربـارۀ تولیـد پـروتئین هیدرولیز شده از این گونه گزارش نشده است، هدف از این تحقیق امکان تولید و دستیابی به شرایط بهینه بـرای عملکرد آنزیم آلکالاز از نظر pH، دمـا، زمـان و نسـبت آنزیم به سوبسترا برای تولید پـروتئین آبکافـت از ایـن گونه است.

## مواد و روش کار

### مواد مورد استفاده

آنزیم آلکالاز با فعالیت ۲/٤ واحد آنسون بر گـرم و با کد P4860 از شرکت سیگما، تری کلرواستیک اسید از شرکت پانراک و آلبومین سـرم گـاوی[1] ، اتـانول، اسـید فسفریک و کوماسی بلو از شرکت مرک خریداری شد.

مـاهی مرکـب ببـری بـا وزن ۲٤۳ ± ۱۳۰٤ گـرم از سواحل بندرعباس صید شده و بلافاصله در دمـای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با حمل هوایی بـه سـاری و سپس در محفظه‌های حاوی یخ به دانشکده علوم دریایی دانشـگاه تربیـت مـدرس منتقـل شـد. عضـلۀ ماهیـان (۷۸±۳۹۳/٤ گـرم) در آزمایشـگاه جـدا شـده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### بهینه‌سازی

از روش سطح پاسخ و در قالب طرح مرکب مرکزی[2] و با استفاده از نرم افزار Design expert نسخۀ ۷ بـرای بهینه‌سازی شـرایط آبکافـت از نظـر pH، دمـا، زمـان و نسبت آنزیم به عضله استفاده شد (جـدول ۱). در ایـن طرح از ۵ سطح برای هر تیمار استفاده و مقـدار آلفـا نیـز برابر ۲ در نظرگرفته شد.

1. BSA
2. Central composite rotatable design



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

**جدول ۱** عوامل و شرایط مورد استفاده در طرح بهینه‌سازی

| عوامل | | محدوده و سطوح (کد) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | نشانه | -α (-۲) | −۱ | ۰ | +۱ | +α (+۲) |
| **pH** | A | ۷ | ۷/۵۰ | ۸ | ۸/۵۰ | ۹ |
| دما (°C) | B | ٤۰ | ٤۵ | ۵۰ | ۵۵ | ٦۰ |
| زمان (دقیقه) | C | ٦۰ | ۹۰ | ۱۲۰ | ۱۵۰ | ۱۸۰ |
| آنزیم (درصد) | D | ۱ | ۱/۵۰ | ۲ | ۲/۵۰ | ۳ |

**تولید پروتئین هیدرولیز شده**

نمونه‌های منجمد به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) گذاشته شد تا انجمادزدایی صورت گیرد. نمونه‌ها با استفاده از چرخ گوشت با منافذی به قطر ۲ میلی‌متر چرخ شده و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد (در حمام آبی) قرارگرفته تا آنزیم‌های درونی آن غیرفعال شوند. به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده، ابتدا ۲۰ گرم از نمونه‌های چرخ شده در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته می‌شوند. سپس میزان ٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و به‌مدت ۱ دقیقه با هموژنایزر (Wiggen، مدل ۵۰۰ D، ساخت آلمان) هموژن شدند. pH نمونه‌ها نیز با استفاده از سود ۰/۲ مولار مطابق با تیمارهای مربوط به طرح مرکب مرکزی در روش پاسخ سطح تنظیم شد (جدول ۲). پس از آن، ظروف حاوی نمونه‌ها در دستگاه انکوباتور متحرک ( Ivymen system, Comecta ساخت اسپانیا) در دماهای پیش‌بینی شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از طی زمان مورد نظر برای فرایند آبکافت (جدول ۲)، به‌منظور قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آبی (Memert، آلمان) قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از خنک شدن تا رسیدن به دمای معمولی اتاق، در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۲۰ دقیقه و با دور g × ۸۰۰۰، سانتریفوژ (مدل universal 320 R، شرکت Hertich، آلمان) شدند و فاز رویی جمع‌آوری شده و میزان درجه هیدرولیز آن محاسبه شد.

**اندازه‌گیری درجه هیدرولیز**

میزان هیدرولیز 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 است. برای این منظور حجم مساوی (نسبت ۱:۱) از محلول پروتئینی جدا شده و محلول (۱ میلی‌لیتر از نمونه با ۱ میلی‌لیتر از محلول تریکلرواستیک اسید ۲۰ درصد (در آب مقطر) مخلوط گردید و پس از به‌هم زدن در دمای ۲۰ درجه با دور g٦۷۰۰ سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول به روش بردفورد اندازه‌گیری و درجه آبکافت از طریق معادله زیر محاسبه گردید (Kristinsson and Rasco, 2000)

معادله ۱:

$$\text{درجه آبکافت} = \frac{\text{محلول ۱۰ صد TCA میز نیتر} \times ۱۰۰}{\text{نمونه میز ل نیتر}}$$



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

**اندازه گیری میزان پروتئین محلول به روش بردفورد (Bradford, 1976)**

۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بلو و ۵۰ میلی‌لیتر اتانول در ارلن ریخته و بر روی استیرر قرار داده شد تا زمانی‌که کوماسی بلو با اتانول خوب حل گردد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۸۵ درصد کم‌کم به آن اضافه شد. پس از اطمینان از حل شدن کامل این سه ماده، محلول مورد نظر را با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده و اجازه داده شد تا بر روی استیرر خوب حل شود. سپس محلول ساخته شده با کمک کاغذ صافی (واتمن شماره یک) فیلترشده تا ذرات معلق و نامحلول جدا شود. محلول به‌دست آمده به‌عنوان معرف بردفورد تا زمان استفاده در ظرف تیره و در دمای یخچال نگهداری شد. تمام مراحل ذکر شده در تاریکی انجام شد.

آزمایش‌های مربوط به سنجش پروتئین محلول در میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای انجام شد و بدین منظور به ۵۰ میکرولیتر از نمونه ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد اضافه و ترکیب حاصل با ورتکس مخلوط گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از ترکیب مذکور با سه تکرار درون میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای ریخته شد و جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. از غلظت ۰ تا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

**نتایج**

طرح مرکب مرکزی در روش پاسخ سطح برای ٤ فاکتور در ۵ سطح و با عدد آلفا برابر ۲ و ٦ نقطهٔ مرکزی تعداد ۳۰ تیمار را برای بهینه‌سازی سازماندهی کرد. درجهٔ هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ۳۰ تیمار از طریق معادلهٔ ۱ محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۲ آمده است. درجهٔ هیدرولیز از ۲۰/٤۸ تا ٤۳/۱۵ درصد متغیربود.

**جدول ۲** طرح مرکب مرکزی (CCRD) در روش پاسخ سطح با ٤ متغیر مستقل و ٦ نقطه مرکزی برای بهینه‌سازی تولید پروتئین آبکافت از عضله ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) خلیج‌فارس با استفاده از آنزیم آلکالاز و درجه هیدرولیز به‌عنوان پاسخ

| شماره آزمایش | pH (A) | دما (B) | زمان (C) | آنزیم (D) | درجه آبکافت (درصد) |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۷/۵ (−۱) | ٤۵ (−۱) | ۹۰ (−۱) | ۱/۵ (−۱) | ۲۱/٤ |
| ۲ | ۸/۵ (+۱) | ٤۵ (−۱) | ۹۰ (−۱) | ۱/۵ (−۱) | ۲۵/۵۱ |
| ۳ | ۷/۵ (−۱) | ۵۵ (+۱) | ۹۰ (−۱) | ۱/۵ (−۱) | ۲۵/۳٦ |
| ٤ | ۸/۵ (+۱) | ۵۵ (+۱) | ۹۰ (−۱) | ۱/۵ (−۱) | ۲۸/٦۱ |
| ۵ | ۷/۵ (−۱) | ٤۵ (−۱) | ۱۵۰ (+۱) | ۱/۵ (−۱) | ۲٤/۰۸ |
| ٦ | ۸/۵ (+۱) | ٤۵ (−۱) | ۱۵۰ (+۱) | ۱/۵ (−۱) | ۲٦/۷۵ |
| ۷ | ۷/۵ (−۱) | ۵۵ (+۱) | ۱۵۰ (+۱) | ۱/۵ (−۱) | ۲۹/۵۲ |
| ۸ | ۸/۵ (+۱) | ۵۵ (+۱) | ۱۵۰ (+۱) | ۱/۵ (−۱) | ۲۹/۰۱ |
| ۹ | ۷/۵ (−۱) | ٤۵ (−۱) | ۹۰ (−۱) | ۲/۵ (+۱) | ۲۸/۱۸ |
| ۱۰ | ۸/۵ (+۱) | ٤۵ (−۱) | ۹۰ (−۱) | ۲/۵ (+۱) | ۳۱/۷ |
| ۱۱ | ۷/۵ (−۱) | ۵۵ (+۱) | ۹۰ (−۱) | ۲/۵ (+۱) | ۲۵/۵۸ |
| ۱۲ | ۸/۵ (+۱) | ۵۵ (+۱) | ۹۰ (−۱) | ۲/۵ (+۱) | ۳۲/۲۳ |



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

ادامهٔ جدول

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱۳ | ۷/۵ (−۱) | ٤۵ (−۱) | ۱۵۰ (+۱) | ۲/۵ (+۱) | ۲۸/۳۱ |
| ۱٤ | ۸/۵ (+۱) | ٤۵ (−۱) | ۱۵۰ (+۱) | ۲/۵ (+۱) | ۳٤/۹ |
| ۱۵ | ۷/۵ (−۱) | ۵۵ (+۱) | ۱۵۰ (+۱) | ۲/۵ (+۱) | ۲۵/۵۸ |
| ۱٦ | ۸/۵ (+۱) | ۵۵ (+۱) | ۱۵۰ (+۱) | ۲/۵ (+۱) | ۳۲/۵۲ |
| ۱۷ | ۷ (−۲) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ۲۷/۷۹ |
| ۱۸ | ۹ (+۲) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ۳٤/۸٦ |
| ۱۹ | ۸ (۰) | ٤۰ (−۲) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ۲۰/٤۸ |
| ۲۰ | ۸ (۰) | ٦۰ (+۲) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ۲۷/٤۷ |
| ۲۱ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ٦۰ (−۲) | ۲ (۰) | ۳٤/۳۳ |
| ۲۲ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۸۰ (+۲) | ۲ (۰) | ٤۰/۲۵ |
| ۲۳ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۱ (−۲) | ۲٤/۲ |
| ۲٤ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۳ (+۲) | ۳۲/٦۷ |
| ۲۵ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ٤۱/۸٦ |
| ۲٦ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ۳۸/۳۹ |
| ۲۷ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ٤۰/٤ |
| ۲۸ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ٤۳/۱۵ |
| ۲۹ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ٤۰/۸۹ |
| ۳۰ | ۸ (۰) | ۵۰ (۰) | ۱۲۰ (۰) | ۲ (۰) | ٤۲/۳۱ |

نتایج آنالیز واریانس طرح مرکب مرکزی در جدول ۳ آمده است. بر این اساس مدل دو جمله‌ای در سطح ۹۹/۹۹۹ درصد معنادار بود (p< ۰/۰۰۰۱). نتایج خطی اختلاف معناداری را در طرح نشان داد و در بین آنها معناداری برای pH بیشتر از بقیهٔ فاکتورها بود و به دنبال آن به‌ترتیب نسبت آنزیم به عضله، زمان و دما قرار داشت.

نتایج اثر متقابل فاکتورها فقط برای اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به عضله معنادار بود. نتایج مربوط به توان دوم فاکتورها هم وجود اختلاف معناداری را بین آنها نشان داد.

**جدول ۳** آنالیز واریانس درجه آبکافت تحت تأثیر ٤ متغیر مستقل در طرح مرکب مرکزی (CCRD) روش پاسخ سطح (RSM) برای مدل درجه ۲

| عوامل | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | شاخص F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| مدل | ۱٤ | ۱۱۸۸/۸٦ | ۸٤/۹۲ | ۲۰/۳۸ | < ۰/۰۰۰۱*** |
| *فاکتورهای مستقل* | | | | | |
| pH-A | ۱ | ۹۳/٤٦ | ۹۳/٤٦ | ۲۲/٤۲ | ۰/۰۰۰۳ *** |
| B-دما | ۱ | ۱۹/۳۷ | ۱۹/۳۷ | ٤/٦۵ | ۰/۰٤۷۷ * |
| C-زمان | ۱ | ۲۳/۸۸ | ۲۳/۸۸ | ۵/۷۳ | ۰/۰۳۰۲ * |



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

ادامهٔ جدول

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| D-نسبت آنزیم به عضله | ۱ | ۸۷/۰۲ | ۸۷/۰۲ | ۲۰/۸۸ | ۰/۰۰۰٤ *** |
| *اثر متقابل فاکتورها* | | | | | |
| AB | ۱ | ۰/۰۲۰ | ۰/۰۲۰ | ۰/۰٤۷ | ۰/۹٤٦۲ |
| AC | ۱ | ۰/۲۱ | ۰/۲۱ | ۰/۰۵۱ | ۰/۸۲٤۸ |
| AD | ۱ | ۱۲/۵۷ | ۱۲/۵۷ | ۳/۰۲ | ۰/۱۰۳۰ |
| BC | ۱ | ۰/۳٦ | ۰/۳٦ | ۰/۰۸٦ | ۰/۷۷۲۹ |
| BD | ۱ | ۳۰/۰۹ | ۳۰/۰۹ | ۷/۲۲ | ۰/۰۱٦۹ * |
| CD | ۱ | ۱/٤۸ | ۱/٤۸ | ۰/۳۵ | ۰/۵٦۰٦ |
| *توان دوم* | | | | | |
| $A^2$ | ۱ | ۲۱۸/٦۷ | ۲۱۸/٦۷ | ۵۲/٤۷ | < ۰/۰۰۰۱ *** |
| $B^2$ | ۱ | ۵۹۵/۸۹ | ۵۹۵/۸۹ | ۱٤۲/۹۸ | < ۰/۰۰۰۱ *** |
| $C^2$ | ۱ | ٤۸/٦۹ | ٤۸/٦۹ | ۱۱/٦۸ | ۰/۰۰۳۸** |
| $D^2$ | ۱ | ۳٤٤/۹۰ | ۳٤٤/۹۰ | ۸۲/۷٦ | < ۰/۰۰۰۱ *** |
| *Residue error* | ۱۵ | ٦۲/۵۱ | ٤/۱۷ | -- | -- |
| نبود تناسب | ۱۰ | ٤۸/٤۲ | ٤/۸٤ | ۱/۷۲ | ۰/۲۸٦۳ |
| خطای خالص | ۵ | ۱٤/۱۰ | ۲/۸۲ | | |
| تصحیح کلی | ۲۹ | ۱۲۵۱/۳۷ | -- | -- | -- |
| $R^2$ | ۰/۹۵ | | | | |
| *Adjusted* $R^2$ | ۰/۹۰۳٤ | | | | |
| *Predicted* $R^2$ | ۰/۷٦۰۹ | | | | |
| *Adeq Precision* | ۱٤/۱٦۰ | | | | |

***P<۰/۰۰۱،** P <۰/۰۱،* P<۰/۰۵

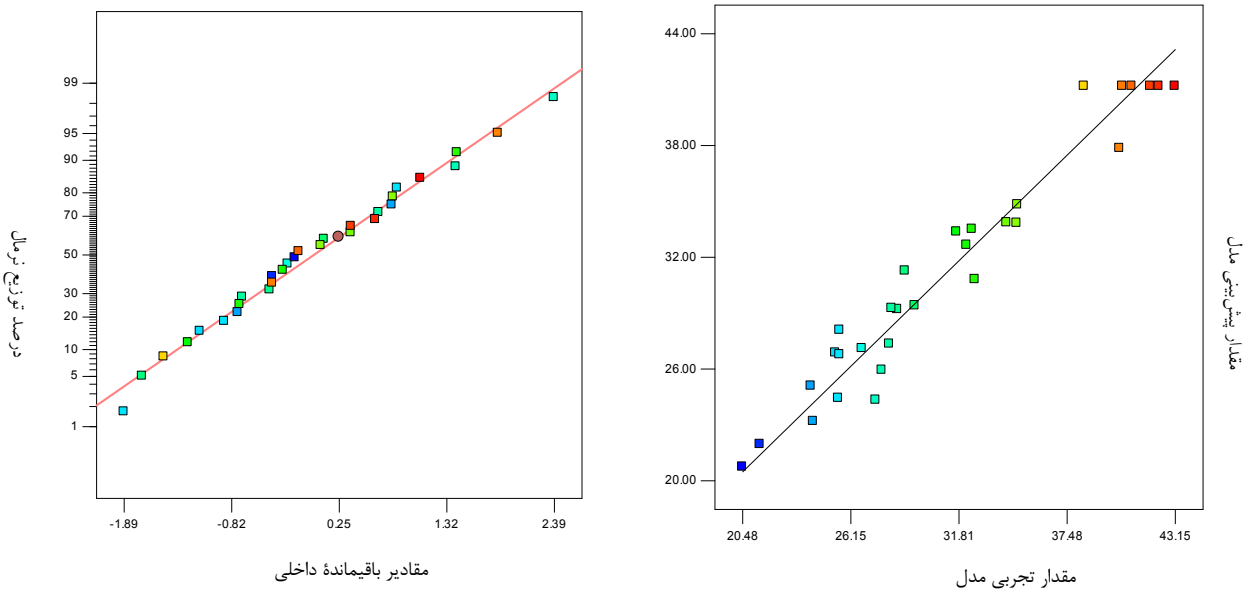
همان‌طورکه در جدول ۳ آمده است، میزان ضریب تعیین کلی برابر ۰/۹۵ و نسبت سیگنال به اختلال[1] ۱٤/۱٦ بود. شکل ۱ نیز نشان‌دهندهٔ توزیع احتمال نرمال داده‌ها و مقایسه نتایج حاصل از تخمین مدل و نتایج واقعی است.

1. Adeq Precision



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]




الف ب

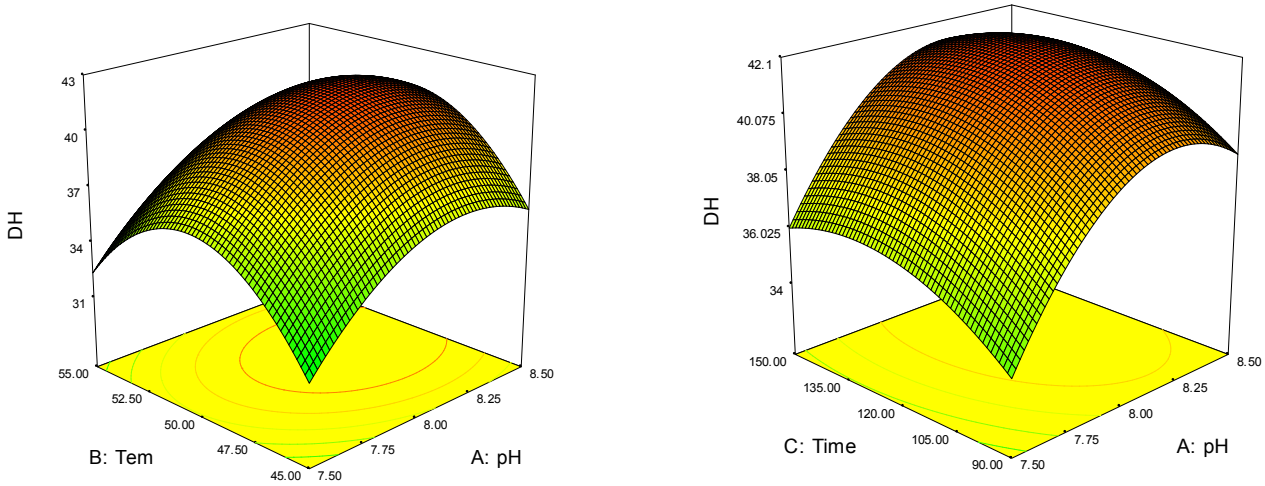
**شکل ۱** مقایسه مقدار پیش‌بینی مدل در برابر مقدار تجربی (الف) و توزیع احتمال نرمال (ب)

در شکل ۲ اثرهای متقابل بین فاکتورها در مدل به‌صورت ۳ بعدی آمده است. همان‌طور که در نمودار آمده است، افزایش میزان دما تا حد خاصی (در محدودهٔ نقاط مرکزی) باعث افزایش میزان درجهٔ هیدرولیز می‌شود و پس از آن با افزایش دما روند نمودار به سمت کاهش پیش می‌رود. چنین روندی برای غلظت آنزیم هم مشاهده شد. نمودار مربوط به زمان نشان می‌دهد که با افزایش زمان هیدرولیز تا حدود ۱۰۰ دقیقه، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد، اما پس از آن روند ثابتی در میزان درجه هیدرولیز مشاهده شد. روند مربوط به pH مشابه زمان بود.

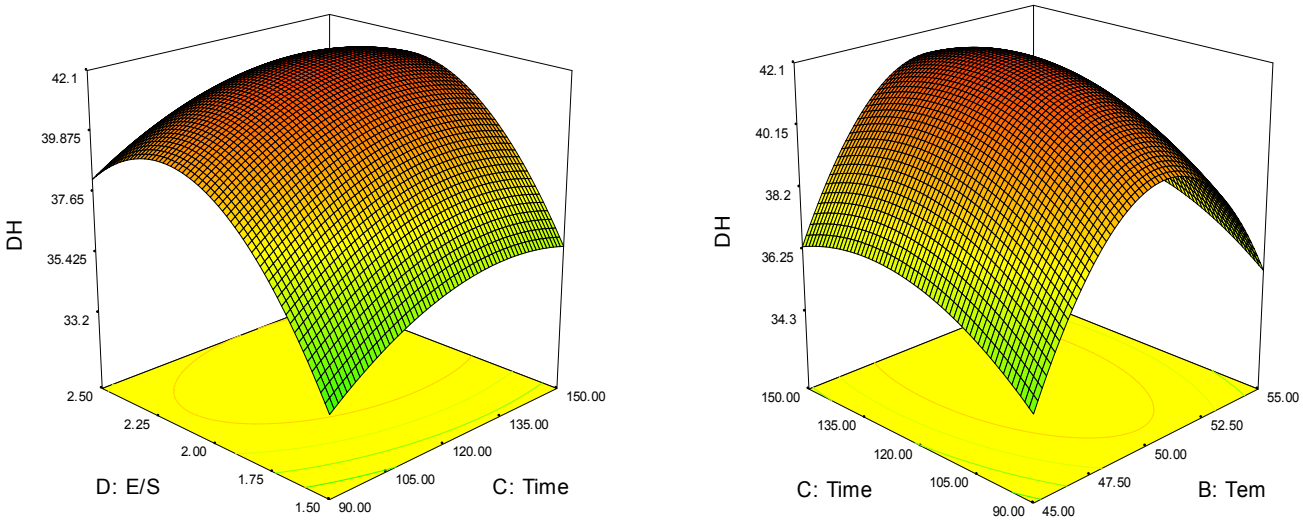


[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]




**شکل ۲** اثرهای متقابل بین فاکتورها در مدل به‌صورت ۳ بعدی




## بهینه‌سازی و معادلهٔ رگرسیونی

ضرایب رگرسیونی به‌منظور پیش‌بینی مدل چند جمله‌ای درجه ۲ با توجه به معناداری فاکتورها (جدول ۳) به‌صورت معادله ۲ آمده است:

معادله ۲:

درجهٔ هیدرولیز = ٤١/١٧ + ١/٩٧A + ٠/٩٠B + C + ١/٩D − ١/٣٧BD − ٢/٨٢$A^{٢}$ − ٤/٦٦$B^{٢}$ − ١/٣٣$C^{٢}$ - ٣/٥٥$D^{٢}$

با استفاده از نرم‌افزار Design Expert شرایط بهینه برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی مرکب ببری به‌دست آمده و در جدول ٤ نمایان شد.



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

**جدول ٤** شرایط بهینه و پیش‌بینی درجهٔ هیدرولیز به‌وسیلهٔ مدل در شرایط بهینه

| شرایط بهینه | | | | پیش‌بینی پاسخ | |
|---|---|---|---|---|---|
| pH | دما (°C) | زمان (دقیقه) | غلظت (درصد) | درجهٔ هیدرولیز (درصد) | مطلوبیت |
| ۸/۱۹ | ۵۰/۲۳ | ۱۲۹/٦۲ | ۲/۱۵ | ٤۲/۰۱۱۷ | ۰/۹۵ |

## بحث

### ارزیابی مدل

ضریب تعیین واقعی[1]، ضریب تعیین تعدیل شده[2]، نبود برازش[3] برای ارزیابی کارایی مدل به‌منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به‌کار می‌رود. ضریب تعیین معیاری است برای تشخیص اینکه چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده می‌شود و هرچه مقدار آن به ۱ نزدیک‌تر باشد، مدل بهتر می‌تواند پاسخ را پیش‌بینی کند (Taheri et al, 2012). در این مطالعه میزان ضریب تعیین و ضریب تعیین تعدیل شده به‌ترتیب برابر ۰/۹۵ و ۰/۹۰۳٤ بود. همچنین هرچه ضریب تعیین تعدیل شده به ضریب تعیین واقعی نزدیک‌تر باشد، بهتر است. ضریب تعیین برابر ۰/۹۵ نشان‌دهندهٔ این است که مدل رگرسیون واکنش را به‌خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۹۵ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به‌دست آمده را توضیح دهد. Little و Hills (1978) گزارش کردند که ضریب تعیین نباید کمتر از ۸۰ درصد باشد.

Adeq Precision بیانگر نسبت سیگنال به اختلال است. برای مدل به‌دست آمده میزان آن برابر ۱٤/۱٦ می‌باشد. میزان این شاخص اگر بالاتر از ٤ باشد مطلوب است.

فقدان برازش برای مدل معنادار نبود ($p>$ ۰/۰۵) و این نشان‌دهندهٔ این است که مدل ایجاد شده توانسته تغییرات را به اندازهٔ کافی توضیح دهد (طاهری و همکاران، ۱۳۹۱). شاخص‌های مربوط به ارزیابی کارایی مدل بیانگر کفایت مدل برای پیش‌بینی پاسخ است.

شکل ۱- الف، مقایسهٔ داده‌های به‌دست آمده (مقادیر تجربی) و داده‌های پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. براساس توضیحات نرم‌افزار، وجود یک تناسب که با خطی با زاویهٔ ٤۵ درجه نسبت به محورها مشخص شده، ارتباط خوب بین آنها را نشان می‌دهد.

شکل ۱- ب، نشان‌دهندهٔ پلات احتمال نرمال است. این پلات پراکنش مقادیر باقیمانده که تفاوت بین میزان عددی پیش‌بینی شده و مقدار تجربی است را نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار مشخص شده مقادیر باقیمانده از یک خط صاف پیروی می‌کنند که نشان‌دهندهٔ تناسب میان مقادیر تجربی و مقادیری است که توسط مدل پیش‌بینی شده است.

### درجهٔ هیدرولیز

مدل خطی برای ٤ فاکتور زمان، دما، غلظت (نسبت آنزیم به سوبسترا) و pH نشان می‌دهد که هر کدام از متغیرها به تنهایی بر درجهٔ هیدرولیز اثر معناداری دارند. با افزایش میزان هر یک از فاکتورها تا محدودهٔ نقطهٔ مرکزی، میزان درجه هیدرولیز افزایش یافت اما پس از آن، با افزایش دما و غلظت، میزان درجهٔ هیدرولیز کاهش یافت و با افزایش زمان و pH میزان درجهٔ هیدرولیز روند ثابتی را از خود نشان داد.

1. R2
2. Adj-R2
3. Lack of fit



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

همان‌طور که در جدول ۲ مشخص شده است، بیشترین میزان درجهٔ هیدرولیز در این مطالعه (۴۳/۱۵ درصد) در نقطه مرکزی یعنی در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، pH برابر ۸، زمان ۱۲۰ دقیقه و غلظت ۲ درصد آنزیم مشاهده شد. See و همکاران (۲۰۱۱) دما و pH بهینه برای آنزیم آلکالاز به‌منظور دستیابی به بالاترین درجهٔ هیدرولیز از ماهی سالمون (*Salmo salar*) را به‌ترتیب ۵۵/۳ درجه سانتی‌گراد و ۸/۳۹ گزارش کردند. Taheri و همکاران (2011) نیز دما و pH بهینه برای آنزیم آلکالاز به‌منظور هیدرولیز ماهی ساردین پهلو طلایی (Sardinella *gibbosa*) را به‌ترتیب ۴۵/۶۲ درجهٔ سانتی‌گراد و ۸/۵ گزارش کردند. Ovissipour و همکاران (2009) دما و pH بهینهٔ این آنزیم را برای هیدرولیز امعا و احشای فیل ماهی (*Huso huso*) به‌ترتیب ۵۰ درجه و ۸/۵ گزارش کردند. Normah و همکاران (2005) برای سیم باله نخی دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۸/۵، Benjakul و Morissey (1997) برای ماهی *Merluccius productus* دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۹/۵ را گزارش کردند.

براساس اطلاعات شرکت سازنده، آنزیم آلکالاز مورد استفاده در این مطالعه در pH قلیایی و در دمای ۶۰ – ۵۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهد (Novozyme, 2001). گزارش‌های متفاوت برای pH و دمای بهینه برای گونه‌های مختلف بیانگر این است که نوع مادهٔ زمینه‌ای (سوبسترا) می‌تواند در فعالیت این آنزیم تأثیرگذار باشد (Herpandi et al, 2013).

همان‌طور که در بالا اشاره شد، با افزایش غلظت آنزیم تا حدود نقطهٔ مرکزی میزان درجهٔ هیدرولیز افزایش یافت، اما پس از آن میزان درجه هیدرولیز کاهش یافت. الگوی مشابهی نیز در پروتئین هیدرولیز شدهٔ امعا و احشای فیل‌ماهی (Ovissipour et al, 2009) و ماهی تن (*Katsuwonus pelamis*) از سوی Herpandi و همکاران (2013) مشاهده شد. این روند کاهشی را می‌توان به کاهش حضور پیوندهای پپتیدی با افزایش غلظت و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم مرتبط دانست (Moreno, 1993). در مطالعهٔ حاضر با افزایش زمان هیدرولیز تا حدود ۱۰۰ دقیقه میزان درجهٔ هیدرولیز نیز افزایش یافت، اما در ادامه و با افزایش زمان روند ثابتی در نمودار میزان درجهٔ هیدرولیز مشاهده شد. این حالت را می‌توان به‌دلیل گسستگی سریع پیوندهای پپتیدی مستعد در ابتدای زمان هیدرولیز دانست. در ادامهٔ روند هیدرولیز به‌دلیل حضور بیشتر پیوندهای پپتیدی مقاوم در برابر آنزیم، این روند در آن مشاهده می‌شود (Herpandi et al, 2013). از طرفی دیگر، پپتیدهای ایجاد شده نیز می‌توانند باعث کاهش درجه هیدرولیز شوند به‌طوری‌که این پپتیدها می‌توانند با پروتئین‌هایی که هنوز هیدرولیز نشدند، برای اتصال آنزیم به آنها (از نظر جایگاه اتصال آنزیم به سوبسترا) باهم رقابت کنند (Adler-Nisse et al, 1986).

## نتیجه‌گیری کلی

هیدرولیز پروتئین‌ها یکی از روش‌های مؤثر و مفید برای تبدیل گونه‌های کم‌مصرف و یا ضایعات آبزیان به فراورده‌هایی با ارزش افزودهٔ بالا می‌باشد. در فرایند هیدرولیز پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچک‌تر تبدیل می‌شوند و از این‌رو بهتر می‌توانند وارد بدن شده و نقش خود را ایفا کنند. از سوی دیگر، امروزه مطالعات زیادی برای تولید بهینهٔ یک محصول در شرایط بهینه انجام می‌شود. روش سطح پاسخ، یک روش ریاضی مؤثر به‌منظور بررسی اثر چندین فاکتور و جستجوی شرایط بهینه برای پاسخ مورد نظر است. در تحقیق حاضر نتایج حاصل از مدل از جمله ضریب تناسب، نبود تناسب و نسبت سیگنال به اختلال



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

نشـان داد کـه مـدل حاضـر از تناسـب و اطمینـان خـوبی به‌منظور پیش‌بینی درجهٔ هیدرولیز عضلهٔ مـاهی مرکـب بـا استفاده از آنزیم آلکالاز برخوردار است.

## منابع


**Adler-Nissen, J., 1986**. Enzymatic hydrolysis of food protein. Elsevier applied Sci. Pub. Ltd., London, Page: 427.

**Arihara, K., 2006**. Strategies for designing novel functional meat products. Meat Science, 74: 219-229.

**Benjakul, S., and Morrissey, M. T., 1997.** Protein hydrolysates fromPacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and FoodChemistry, 45: 3423–3430.

**Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S.M., Kristinsson, G.H., 2014.** Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. In: Kristinsson, G.H. (Eds.), Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods. Wiley Blackwell, UK, pp. 237-281.

**Bhaskar, N., Sudeepa, E.S., Rashmi, H.N., Tamilselvi, A., 2007.** Partial purification and characterization of protease of Bacillus proteolyticus CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. Bioresource Technology 98(14): 2758-2764.

**Bradford, M., 1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72: 248-254.

**Chalamaiah, M., Kumar, B. D., Hemalatha, T., Jyothirmay, T., 2012**. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Food Chemistry, 135: 3020-3038.

**Hammes, W. P., Haller, D., & Ganzle, M. G., 2003**. Fermented Meat. In E. R. Farnworth (Ed.), Handbook of Fermented Functional Foods. New York, NY, USA: CRC, 408 p.

**Herpandi, N., Huda, A., Rosma W.A., Wan Nadiah., 2013**. Optimizing the Enzymatic Hydrolysis of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Dark Flesh Using Alcalase® Enzyme: A Response Surface Approach. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 8: 494-505.

**Kristinsson, G.H., 2006.** The Production, Properties, and Utilization of Fish Protein Hydrolysates. In: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. (Eds.), Food Biotechnology. CRC press, Boca Raton, pp. 1109-1133.

**Kristinsson, H. G., Rasco, B. A., 2000**. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functionalproperties. Critical Review inFood Science and Nutrition, 40: 43–81.

**Little, T M and Hills F J, 1978**. Agricultural experimentation: Design and analysis, John wiley and sons, New York, Page: 350

**Moreno, M. C., 1993**. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. Process biochemistry, 28 (7): 481-490.

**Normah I, Jamilah B, Saari N, Yaakob Che Man B (2005)** Optimization of hydrolysis conditions for theproduction of threadfinbream (*Nemipterus japonicas*) hydrolysate by Alcalase .Journal of Muscle Foods, 16:87–102.

**Novozymes, 2001**. Alcalase 2.4L® application sheet. Novozymes A/S, Denmark.

**Oosterveer, P., 2008**. Governing global fish provisioning: Ownership and management of marine resources. Ocean and Coastal Management, 51: 797–805.

**Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Esmaeili Mulla, A., 2009**. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeons *Huso huso*using Alcalase. International Aquatic Research, 1: 31-38.

**See, S., F, Hoo, L., L, Babji, A., S, 2011.** Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase International food research journal, 18: 1359-1365.

**Taheri, A., Abedian kenari, A., Motamedzadegan, A., Habibi Rezaei, M., 2011**. Optimization of goldstripe sardine (*Sardinella gibbosa*) protein hydrolysate using Alcalase1 2.4Lby response surface methodology. CyTA - Journal of Food, 9: 114-120.

**Taheri, A., Abedian Kenari, A. M., Motamedzadegan, A., Habibi Rezaei, M., 2012**.




[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

**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.

Process optimization of Poultry By-products hydrolysate production by RSM. Iranian Journal of Food Science and Technology, 34: 65-76. (Abstarct in English)

[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 1, Spring 2016

# Optimization of Persian Gulf cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle hydrolysate production by RSM

**Ali Hamzeh[1], Masoud Rezaei[2*], Saber khodabandeh[3], Ali Motamedzadegan[4], Mehrdad Norozinia[5]**

1- Ph.D. Candidate, Dept. Seafood Processing, Faculty of Marin Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Professor, Dept. of Seafood processing, Faculty of Marin Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3- Associate Prof, Dept. of Marine biology, Faculty of Marin Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

4- Assistant Prof, Department of Food Science, College of Agricultural Engineering Sari, Iran.

5- Associate Prof , Department of Hematology, School of Medicine, Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 02.03.2015 Accepted: 01.02.2016
*Corresponding author: rezai_ma@modares.ac.ir

## Abstract

The response surface methodology was employed to optimize the effects of pH, temperature (˚C), time (min) and the ratio of enzyme to substrate (% of substrate) on the hydrolysis process of cuttlefish muscle by alcalase. Central composite rotatable design with 5 levels and 4 factors and α=2 was used for the optimization of the process to gain the highest degree of hydrolysis. pH, temperature, time, enzyme concentration, interaction of temperature-enzyme concentration, square of pH, temperature, time and enzyme concentration had significant effects on the process. The R2 = 0.95, lack of fit < 0.05 and adeq-Precision of 14.16 for the model showed that the model could explain the variability within the range of values. The optimum condition for 42.0117 % of degree of hydrolysis was determined by Design Expert as pH 8.19, temperature 50.23, time 129.62 and enzyme2.15%.

**Keywords*:*** Cuttlefish, Hydrolysate, RSM, Alcalase, CCRD



[ Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.6.1 ]