مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۱۲ شماره ۳، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۲۷۶ تا ۲۶۱

استفاده از روش تغییر pH جهت تولید پروتئین ایزوله از سر ماهی خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*): بررسی ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های عملکردی

سیده منا حسینی چوپانی، مسعود رضائی*، سمانه پزشک

گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۱۷

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷

***نویسنده مسول:**
rezai_ma@modares.ac.ir

چکـــیده

هدف از این تحقیق، تولید پروتئین ایزوله از سر ماهی خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*) و بررسی خواص عملکردی و ساختاری آن بود. پروتئین ایزوله ماهی با روش تغییرpH با استفاده از pH های قلیایی ۱۰/۵، ۱۱، ۱۱/۵، ۱۲ و ۱۲/۵ تولید شد. نتایج نشان داد که بازده استخراج پروتئین و مقدار اسید آمینه ضروری آن در pH ۱۱/۵ بیش از سایر تیمارها بود. همچنین نتایج حاصل از تعیین ویژگی‌های عملکردی از قبیل خاصیت امولسیفایری، کف‌کنندگی، حلالیت ایزوله‌های پروتئینی و ... نشان داد که با افزایش pH ویژگی‌های عملکردی بهبود یافته و پروتئین ایزوله شده در PH ۱۱/۵ نسبت به تیمارهای دیگر به طور معنی‌داری برتری داشت ($p<0.05$). همچنین وزن مولکولی پروتئین در سنجش (SDS) در pH ۱۱/۵ سبب ایجاد شکست در ساختار شد و کم‌ترین میزان مشاهده شد. مقایسه خصوصیات رنگی (L، a و b) پروتئین‌های ایزوله شده نشان داد پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲ رنگ روشن‌تر (پارامتر L بالاتر) نسبت به پروتئین‌های ایزوله شده در سایر تیمارهای مورد سنجش، داشت. همچنین با افزایش میزان pH میزان قرمزی (پارامترa) و زردی (پارامترb) پروتئین‌های ایزوله کاهش یافت. نتایج حاصل از آزمون‌های حسی در بررسی بو و طعم نشان داد که پروتئین ایزوله شده در PH ۱۱/۵ بیشترین میزان محبوبیت را در بین سایر تیمارها داشته است. با توجه به موارد مشاهده شده، نتایج نشان‌دهنده آن بود که پروتئین ایزوله حاصل از سر ماهی خاویاری سیبری تولید شده ویژگی‌های عملکردی مطلوبی دارد و استفاده از روش تغییرpH قلیایی می‌تواند منجر به بهبود خواص عملکردی و پارامترهای رنگی ایزوله پروتئینی شود.

کـــلید واژه‌ها: خواص عملکردی- پروتئین ایزوله - ماهی خاویاری سیبری – تغییرPH

مقدمه

پروتئین‌ها ماکرومولکول‌ها و پلیمرهای بسیار پیچیده‌ای هستند که ویژگی‌های عملکردی آن‌ها بستگی به ساختار شیمیایی آن‌ها دارد. هرگونه تغییر در ساختار این ترکیبات می‌تواند باعث بهبود و افزایش عملکرد آن‌ها شود. ضایعات حاصل از فرآوری ماهیان و سخت‌پوستان بیش از۵۰٪ از وزن کل ماهی‌ها را تشکیل می‌دهد[1]، که منبعی غنی از پروتئین‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع، همچنین ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشند [2]. یکی از موضوعات مهم در صنعت عمل‌آوری محصولات دریایی تولید محصولاتی با ارزش افزوده جهت بالا بردن درآمدزایی، کاهش هزینه‌های دفع و کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از دور ریختن این ضایعات می‌باشد[3]. پروتئین ایزوله ماهی نوعی ترکیب پروتئینی است که از انواع مختلف مواد خام تهیه شد. این ترکیب مستقیما مورد استفاده قرار نمی‌گیرد بلکه به عنوان یک ماده افزودنی در محصولات غذایی با هدف تولید فرآورده‌های با ارزش افزوده در صنایع غذایی استفاده می‌شود. پروتئین ایزوله به دلیل ویژگی‌های عملکردی می‌تواند به عنوان عامل تشکیل ژل، افزایش ارزش تغذیه‌ای محصول، تشکیل امولسیون و کف و ... استفاده شود. یکی از روش‌های تهیه ایزوله پروتئین، استخراج پروتئین به روش تغییر pH قلیایی می‌باشد. در سال‌های اخیر نشان داده شده است که این روش باعث افزایش میزان بازده تولید پروتئین و همچنین کاهش زمان استخراج آن می‌شود[4]. گونه‌ی تاس ماهی سیبری (*A.baerii*) جز اقتصادی‌ترین گونه‌های پرروشی است که در جهان و ایران مورد توجه قرار گرفته است که در حین عمل آوری مقدار توجهی از ضایعات زیستی را تولید می‌کند. سر این ماهی حدود ۱۷٪ از وزن بدن را شامل می‌شود که می‌تواند منبع مناسبی جهت استخراج ترکیبات ارزشمندی همچون پروتئین ایزوله در نظر گرفته شود[5]. یکی از ساده‌ترین روش‌های استخراج پروتئین، استفاده از روش قلیایی است که به شکل گسترده‌ای جهت بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین ایزوله استفاده شده است که می‌تواند حلالیت و توانایی تشکیل امولسیون و تشکیل کف پروتئین را افزایش دهد. این ترکیب یک محصول حد واسط با ارزش تغذیه‌ای مناسب، با درصد

پایین چربی و درصد بالای پروتئین (بالای ۹۰٪) می‌باشد که می‌تواند به عنوان ماده‌ی افزودنی با هدف بهبود خواص عملکردی و تغذیه‌ای در صنایع غذایی حائز اهمیت باشد[6]. بنابراین، هدف از این تحقیق تولید پروتئین ایزوله از سر تاس ماهی سیبری به روش تغییر pH قلیایی و بررسی ویژگی‌های عملکردی ایزوله‌های پروتئینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سر ماهی خاویاری سیبری (*A.baerii*) به عنوان ماده خام اولیه، از مزرعه پرورش واقع در (محمود آباد) تهیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه دانشکده‌ی علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس (نور) جهت آماده سازی و انجام آزمایشات مربوطه منتقل گردید. سر ماهی توسط چرخ گوشت با قطر ۵ میلی‌متر چرخ و بسته‌بندی شد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- نگهداری شد[7].

تهیه پروتئین ایزوله به روش تغییر pH

با توجه به شکل (۱)، جهت تولید پروتئین ایزوله، گوشت چرخ شده ماهی با آب مقطر به نسبت (W/W۶:۱) با دستگاه هموژنایزر (T 25 digital ULTRA-TURRAX, Germany) هموژن گردید. به منظور حل شدن پروتئین‌ها، محلول همگن شده با NaOH (۲ مولار) درpH های ۱۰/۵، ۱۱، ۱۱/۵، ۱۲و ۱۲/۵ تنظیم گردید. سپس از سانتریفیوژ یخچال‌دار برای رسوب و جداسازی مواد نامحلولی همچون استخوان، پوست، فلس و ناخالصی‌ها استفاده شد. پس از سانتریفیوژ اول، با استفاده از کاغذ صافی، لیپیدهای لایه‌ی فوقانی و لایه زیرین رسوبات جدا شدند و مایع‌رویی جمع آوری شده به pH ایزوالکتریک پروتئین (۵/۵) رسید. سپس از سانتریفیوژ جهت ته‌نشینی و جداسازی پروتئین‌های ایزوله استفاده گردید. در نهایت نمونه‌های استحصالی با استفاده از فریزدرایر (D-37520, Germany) شدند و نمونه‌های پودر شده در ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند[8].

آنالیز تقریبی

برای تعیین میزان رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی از روش‌های استاندارد AOAC استفاده گردید[9].

اندازه‌گیری حلالیت و بازده پروتئین

با اندازه گیری محتوای پروتئین بازده حلالیت پروتئین (۱)، بازده استخراج پروتئین (۲) هموژن اولیه در pH هدف (H) و پروتئین جدا شده با استفاده از روش کجلدال تعیین شد[10]. محتوای پروتئین در هر دو مایع رویی اول (S_1) و مایع رویی دوم (S_2) نیز با استفاده از روش Lowry که توسط Markwell [11] اصلاح شده است، اندازه‌گیری شد.

$$\text{بازده حلالیت پروتئین (۱} = \frac{\text{حجم اولیه سوپرناتنت} \times \left(\frac{mg}{ml}\right) \text{محتوای پروتئین سوپرناتنت اول}}{\text{حجم اولیه محتوای پروتئین ایزوله} \times \left(\frac{mg}{ml}\right) \text{محتوای پروتئین ایزوله}} \times ۱۰۰$$

$$\text{بازده استخراج پروتئین (۲} = \frac{\text{محتوای پروتئین سوپرناتنت دوم} - \text{محتوای پروتئین سوپرناتنت اول}}{\text{محتوای پروتئین ایزوله}} \times ۱۰۰$$

ترکیب اسید آمینه

به منظور تعیین ترکیب اسیدهای‌آمینه، در ابتدا نمونه‌ها در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت با استفاده از اسید هیدروکلریدریک ۶ نرمال هیدرولیز شدند. سپس لوله‌های هضم در آون قرار داده شدند و حجم درون لوله‌های با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میلی‌لیتر رسانیده شد، سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی، فیلتر گردیدند. با استفاده از ماده او- فتال دی آلدهید (OPA) عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام شد[12] میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از ستون C18 سنجش شد.

قدرت تشکیل و پایداری کف

تشکیل کف (FC) و پایداری کف (FS) نمونه‌های پروتئینی با روش Xiong و همکاران اندازه‌گیری شد[13]. ۱ گرم از نمونه‌های پروتئینی در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از هموژنایزر آزمایشگاهی با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق هموژن شد.

1) $FC\ (\%) = \frac{V1}{10} \times 100$

2) $FS\ (\%) = \frac{V2}{V1} \times 100$

ظرفیت کف کردن (FC) در مقایسه با حجم کف بلافاصله پس از همگن سازی (V_1) با حجم مایع اولیه نمونه‌ها (۱۰ میلی‌لیتر) به عنوان معادله (۱) تعیین شد، در حالی که پایداری کف (FS) با مقایسه حجم کف در ۳۰ ثانیه (V_2) نسبت به حجم کف اولیه نمونه (V_1) به صورت معادله (۲) محاسبه گردید.

حداقل غلظت تشکیل ژل

حداقل غلظت لازم جهت تشکیل ژل براساس روش Benelhadj و همکاران[14] مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های پروتئین در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در غلظت‌های ۵٪ ، ۱۰٪ ، ۱۵٪ و۲۰ ٪ حل شدند و به مدت ۱ ساعت در حمام آب در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس به سرعت به وسیله‌ی آب روان خنک شدند، و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. کمترین غلظت که در هنگام واژگونی لوله حاوی محلول پایین نیفتاده است به عنوان حداقل غلظت تولید ژل در نظر گرفته شد.

آنالیز رنگ

رنگ نمونه پروتئین ایزوله توسط دستگاه رنگ‌سنج (Micromatch, Germany) مورد آنالیز قرار گرفتند. متغییر L برای بیان شاخص روشنایی (۰) بعد سیاهی تا (۱۰۰) بعد سفیدی، شاخص a برای بیان قرمزی- سبزی (a+ نشان دهنده قرمزتر و a- نشان دهنده سبزتر)، شاخص b برای بیان بعد زرد- آبی (b+ نشان دهنده زردتر و b- نشان دهنده آبی‌تر) می‌باشد[15].

ظرفیت نگهداری آب

یک گرم از هر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و بعد از ۳۰ ثانیه ورتکس کردن، به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شد. سپس حجم سوپرناتانت اندازه گیری شد. ظرفیت نگهداری آب بر اساس میلی‌لیتر آب جذب شده به ازای گرم پروتئین نمونه بیان شد[16].

$$\text{ظرفیت نگهداری آب} = \frac{\text{میلی لیتر آب جذب شده}}{\text{یک گرم نمونه}}$$

میزان جذب روغن

یک گرم از نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر روغن سویا مخلوط و بعد از ۳۰ ثانیه ورتکس کردن، به مدت ۲۵ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس روغن اضافه دور ریخته شد و ظرفیت نگهداری روغن بر اساس اختلاف وزن نمونه‌ها قبل و بعد از سانتریفیوژ محاسبه گردید[16].

ظرفیت تشکیل امولسیون

شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI) پروتئین‌های ایزوله شده با توجه به روش توصیف شده توسط Xi و همکاران [17] تعیین شد. با کمی تغییر، ۳ میلی‌لیتر روغن ذرت با ۵ میلی‌لیتر از محلول ۱ درصد نمونه‌ی پروتئینی ماهی با استفاده از هموژنایزر آزمایشگاهی با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق هموژن شد. سپس بلافاصله و ۱۰ دقیقه بعد ۵۰ میکرولیتر از امولسیون ته ظرف برداشته شد و در ۵ میلی‌لیتر محلول سدیم دودسیل سولفات ۰/۱٪ (SDS) همگن شد و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس جذب محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. EAI و ESI به صورت معادلات (۴) و (۵) محاسبه شدند.

$$4)\ EA\ (\frac{m2}{g}) = \frac{2\times2.303}{C\times(1-\varphi)\times10} A0 \times dilution$$

$$5)\ ESI\ (\%) = \frac{A10}{A0} \times 100$$

سنجش وزن مولکولی از طریق SDS-PAGE

پروتئین‌ها در مرحله‌ی هموژن اولیه، مایع رویی پس از مرحله سانتریفیوژ ۱ و ۲ توسط SDS-PAGE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌ها که از معرف‌های الکتروفورز و مونتاژ با تغییرات جزئی استفاده شد. در این روش نمونه‌های پروتئینی با حجم مناسب از (نمونه بارگیری شده بافر× ۵) و سپس با انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۵ دقیقه در انباشتگی ژل۵۰٪ انجام شد. حل شدن پروتئین‌ها بر روی ژل ۱۲٪ با جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر به مدت ۴-۳ ساعت انجام شد. ۴ میکروگرم نشانگر وسیع نیز روی هر ژن بارگذاری شد. پس از اتمام الکتروفورز، رنگ آمیزی به مدت یک شب با Coomassie Brilliant Blue R250 مطابق پروتکل‌های استاندارد انجام شد[4].

آزمون ارزیابی حسی

برای ارزیابی ویژگی‌های حسی از پودر پروتئین ماهی در قالب یک محلول ۱٪ (۱ گرم پودر پروتئین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) استفاده شد (Abdollahi و Undeland، ۲۰۱۸). محلول‌های پروتئینی ۱ ساعت قبل آماده شدند و به صورت سرد نگهداری شدند. جهت ارزیابی از افراد نیمه آموزش دیده استفاده شد. بو و طعم و عطر محلول‌های پروتئینی در ۲ تکرار ارزیابی گشت. افراد به ویژگی‌های نام برده شده از عدد صفرتا ۸ امتیازدهی کردند به طوریکه هر چه امتیاز به عدد ۸ نزدیکتر شد میزان خوشایندی نیز بیشتر شده است. فاصله بین هر ارزیابی ۱۰ دقیقه بود و در مورد طعم هم پس از هربار ارزیابی دهان با یک لیوان آب شسته شد[17].

آنالیز آماری

به منظور تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. بررسی نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون شاپیرووویک (Shapiro-Wilk) و سپس همگنی واریانس آن‌ها از طریق آزمون لون (Leven) بررسی گردید. جهت مقایسه آماری تیمارهای مختلف از تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) در قالب آزمون دانکن در راستای مقایسه چندگانه میانگین‌ها استفاده شد. همچنین جهت ارزیابی آزمون حسی از روش ناپارامتریک که طبق آن از آزمون کروسکال والیس (Kruskal-Wallis) بررسی گردید ($p< 0.05$).

نتایج

آنالیز تقریبی

نتایج مربوط به درصد ترکیبات شیمیایی ضایعات سر ماهی خاویاری سیبری، در pH قلیایی در جدول ۱ آورده شده است. همانطور که نتایج ترکیب شیمیایی نمونه‌ها نشان می‌دهد، نمونه ضایعات سر دارای ۴/۶۱٪ چربی و ۷۵/۸۶٪ رطوبت و ۵/۱۴٪ خاکستر بود که به طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های قلیایی بیشتر بوده است. با این وجود، pH ۱۱/۵ بیشترین میزان پروتئین را نسبت به سایر تیمارهای قلیایی داشته است. همچنین بازده پروتئین بازیافتی در pH ۱۱/۵ مقدار ۸۴/۲۲٪ را به خود اختصاص داده است (P <۰/۰۵).

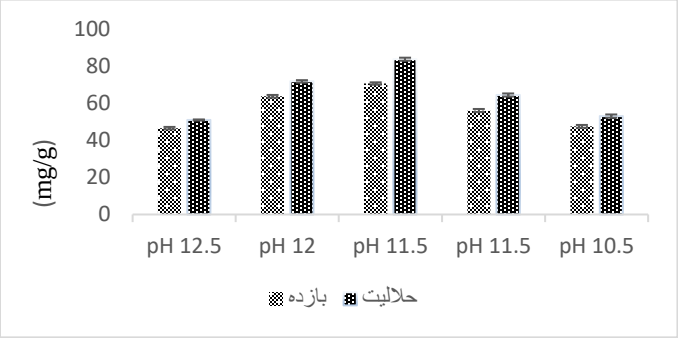
جدول۱: درصد ترکیبات شیمیایی پروتئین‌های ایزوله شده سر تاس ماهی سیبری در pH های قلیایی

pH	چربی(dw٪)	پروتئین (dw٪)	رطوبت (٪)	خاکستر (dw٪)
ضایعات سر	۴/۶۱ ± ۰/۱۶^{a}	۶۹/۶۶ ± ۰/۰۸^{f}	۷۵/۸۶ ± ۰/۰۴^{a}	۵/۱۴ ۰±/۰۵^{a}
۱۰/۵	۳/۵۲ ۰±/۰۷^{b}	±۵۹/۷۴ ۰/۰۷^{e}	۸/۲۰ ± ۰/۰۳^{b}	۳/۷۸ ± ۰/۰۳^{b}
۱۱	۳/۱۲ ± ۰/۰۵^{c}	۷۸/۱۶ ± ۰/۰۴^{d}	۷/۶۳ ± ۰/۰۶^{c}	۳/۱۷ ۰±/۰۱^{c}
۱۱/۵	۲/۰±۶۲/۱۹^{d}	±۲۲/۸۴ ۰/۰۹^{a}	۷/۱۰ ± ۰/۰۷^{d}	۲/۸۲ ۰±/۰۳^{d}
۱۲	۱/۰±۶۰/۱۱^{e}	۸۱/۳۴ ± ۰/۱۲^{b}	۶/۸۴ ۰±/۰۴^{e}	۲/۳۳ ± ۰/۰۴^{e}
۱۲/۵	۱/۱۶ ۰±/۱۱^{f}	۷۹/۳۶ ۰±/۰۵^{c}	۶/۳۱ ۰±/۰۱^{f}	۱/۸۲ ۰±/۰۶^{f}

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است($p < 0.05$).

حلالیت و بازده پروتئین

درصد بازده استخراج و حلالیت پروتئین به دست آمده در طی فرآیند تغییر pH از سر ماهی خاویاری سیبری در شکل ۱ و ۲ آورده شده است. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که روش تغییر pH بر میزان بازده استخراج و حلالیت پروتئین نمونه‌های مورد مطالعه، تاثیر معنی‌داری را نشان داد. در شکل ۱ بیشترین میزان بازده استخراج پروتئین در شرایط قلیایی ۷۰/۶۰٪ در pH ۱۱/۵ در مقایسه با سایر pH های مورد مطالعه بود. (P <۰/۰۵). همچنین در شکل۲ بیشترین میزان حلالیت ۸۳/۷۰٪ در pH ۱۱/۵ مشاهده شد (P <۰/۰۵).



شکل۱: بازده استخراج و حلالیت پروتئین‌های ایزوله شده در pH های قلیایی

ترکیب اسیدهای آمینه

ترکیب اسیدهای آمینه نمونه سر ماهی خاویاری سیبری و پروتئین ایزوله های شده با روش تغییر pH قلیایی در جدول۲ خلاصه شده است. نتایج نشان می‌دهد که اسید آمینه‌های آسپاراتیک اسید، گلوتامیک اسید، گلایسین، آرژنین در نمونه اولیه نسبت به پروتئین‌های ایزوله عدد بالاتری را به خود اختصاص دادند. همچنین اسیدهای آمینه ضروری مختلف شامل هیستیدین، ترئونین، والین، فنیل آلانین، ایزولوسین، میتونین، لوسین و لیزین در پروتئین‌های ایزوله به دست آمده به روش قلیایی نسبت به نمونه اولیه به طور معنی‌داری بیشتر می‌باشد، به طوریکه در pH ۱۱/۵ نسبت به سایر تیمارهای قلیایی بالاترین میزان را به خود اختصاص داد (P <۰/۰۵).

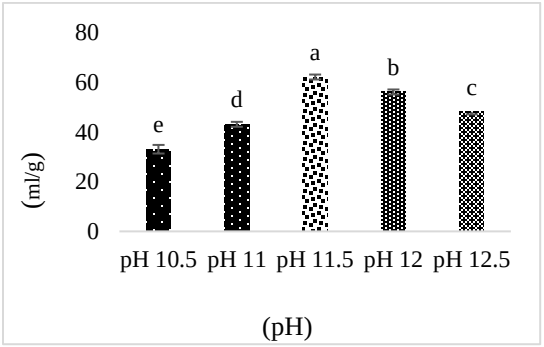
جدول ۲: ترکیب اسیدهای آمینه نمونه چرخ شده ماهی و پروتئین‌های ایزوله شده در pH های قلیایی

نوع اسیدآمینه	نمونه اولیه	۱۰/۵	۱۱	۱۱/۵	۱۲	۱۲/۵	FAO/ WHO بزرگسال
آسپارتیک اسید	۱۲/۲۶±۰/۰۹^{a}	۹/۲۳±۰/ ۰۵^{c}	۸/۷۳±۰/۰۵^{d}	۹/۵۶±۰/۰۶^{b}	۸/۵۳±۰/۰۶^{e}	۷/۰۲±۰/۰۶^{f}	
گلوتامیک اسید	۱۰/۱۳±۰/۱۲^{a}	۸/۰۵±۰/۱۲^{f}	۸/۸۶±۰/۰۵^{d}	۹/۶۰±۰/۰۵^{b}	۸/۴۳±۰/۰۶^{e}	۹/۲۳±۰/۰۷^{c}	
سرین	۱۲/۸۲±۰/۰۶^{a}	۷/۲۶±۰/۰۴^{d}	۷/۷۰±۰/۰۶^{c}	۸/۲۳±۰/۰۲^{b}	۶/۵۰±۰/۰۶^{e}	۵/۱۰±۰/۰۶^{f}	
هیستیدین	۴/۶۳±۰/۰۶^{f}	۶/۶۸±۰/۰۶^{d}	۷/۵۴±۰/۰۷^{c}	۹/۹۴±۰/۱^{a}	۸/۰۶±۰/۰۵^{b}	۶/۱۲±۰/۰۷^{e}	۱/۵
گلایسین	۵/۴۳±۰/۰۴^{a}	۳/۰۵±۰/۰۸^{f}	۴/۲۰±۰/۰۶^{c}	۴/۹۲±۰/۳^{b}	۳/۹۵±۰/۱^{d}	۳/۴۳±۰/۰۸^{e}	
ترئونین	۱/۱۶±۰/۰۳^{f}	۳/۲۴±۰/۰۴^{e}	۴/۳۵±۰/۰۳^{b}	۵/۸۶±۰/۵^{a}	۴/۰۱±۰/۰۶^{c}	۳/۷۶±۰/۰۶^{d}	۲/۳
آرژنین	۷/۳۸±۰/۰۶^{a}	۴/۴۰±۰/۲^{f}	۵/۳۲±۰/۰۷^{e}	۶/۸۷±۰/۰۸^{b}	۵/۷۳±۰/۰۵^{d}	۶/۱۲±۰/۰۴^{c}	
آلانین	۳/۵۲±۰/۰۶^{f}	۷/۱۳±۰/۱۲^{b}	۶/۷۳±۰/۰۵^{c}	۷/۹۶±۰/۱^{a}	۶/۰۱±۰/۰۹^{e}	۶/۴۵±۰/۰۳^{d}	
تیروزین	۱/۲۰±۰/۰۴^{f}	۳/۹±۰/۰۸^{b}	۳/۰۱±۰/۰۵^{d}	۲/۲۰±۰/۱^{e}	۴/۸۵±۰/۰۷^{a}	۳/۴۱±۰/۰۳^{c}	
متیونین	۶/۴۳±۰/۰۳^{b}	۴/۷۲±۰/۰۸^{f}	۵/۲۶±۰/۰۵^{e}	۶/۹۷±۰/۰۸^{a}	۶/۱۱±۰/۰۵^{c}	۵/۷۳±۰/۰۶^{d}	۱/۶
والین	۴/۵۲±۰/۱۴^{f}	۸/۰۲±۰/۵^{d}	۷/۳۰±۰/۰۸^{e}	۱۲/۸۳±۰/۰۸^{a}	۹/۸۰±۰/۰۹^{b}	۹/۲۵±۰/۰۸^{c}	۳/۹
فنیل آلانین	۱/۴۴±۰/۰۳^{f}	۲/۱۰±۰/۰۵^{d}	۱/۸۳±۰/۰۵^{e}	۴/۸۶±۰/۰۸^{a}	۳/۰۱±۰/۰۷^{b}	۲/۷۳±۰/۰۳^{c}	۱/۹
ایزولوسین	۵/۱۵±۰/۰۵^{f}	۷/۲۴±۰/۰۶^{d}	۶/۷۳±۰/۰۳^{e}	۸/۸۲±۰/۰۳^{a}	۸/۲۴±۰/۰۵^{b}	۷/۷۲±۰/۰۴^{c}	۳
لوسین	۵/۵۰±۰/۰۹^{f}	۹/۱۲±۰/۱۳^{d}	۱۳/۲۱±۰/۰۵^{b}	۱۶/۶۳±۰/۰۵^{a}	۹/۵۶±۰/۰۸^{c}	۷/۶۳±۰/۰۶^{e}	۵/۹
لیزین	۲/۵۴±۰/۰۴^{e}	۳/۷۵±۰/۰۵^{c}	۴/۲۳±۰/۰۶^{b}	۸/۱۶±۰/۰۶^{a}	۳/۰۶±۰/۰۶^{d}	۱/۰۳±۰/۰۴^{f}	۴/۵
مجموع‌اسید	۳۲/۳۷	۴۴/۸۷	۵۰/۴۵	۷۴/۰۷	۵۱/۹۴	۴۳/۹۷	
اسیدهای‌آمینه	۰/۳۸	۰/۵۱	۰/۵۳	۰/۶۰	۰/۵۴	۰/۵۱	

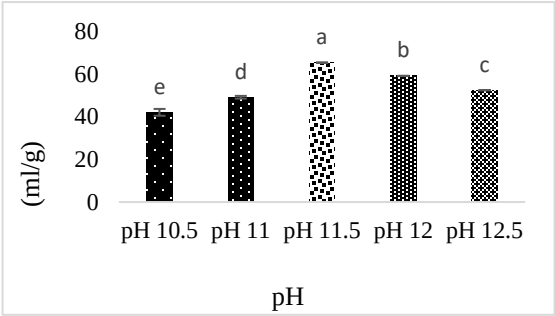
حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($p < 0.05$).

قدرت تشکیل کف (FC) و پایداری کف (FS)

شاخص‌های قدرت تشکیل کف و پایداری کف در pH های قلیایی در شکل ۲ و ۳ آورده شده است. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که تفاوت معنی‌داری در میزان قدرت تشکیل کف مشاهده شد و بیشترین مقدار آن ۶۲/۰۰٪ در pH ۱۱/۵ به دست آمد (P <۰/۰۵). شکل ۳ شاخص پایداری کف در شرایط قلیایی ۶۵/۳۳٪ در pH ۱۱/۵ بالاترین درصد را به خود اختصاص داد (P <۰/۰۵).



شکل ۲: قدرت تشکیل کف پروتئین‌های ایزوله شده در pH های قلیایی



شکل ۳: پایداری کف پروتئین‌های ایزوله شده در pH های قلیایی

تشکیل ژل

مقادیر شاخص تشکیل ژل در pH های مختلف در جدول ۳ آمده است. مشاهده شد که در pH ۱۱/۵ در غلظت ۲۰٪ تشکیل ژل نسبت به سایر تیمار ها بیشتر بود. ($p < 0.05$).

جدول ۳: پارامترهای رنگ و تشکیل ژل در پروتئین‌های ایزوله شده در pH های قلیایی

pH	L	a	b	کمترین غلظت ژل دهی (g/۱۰۰ml)
۱۰/۵	۳۸/۷۹ ± ۰/۱۳^{e}	۴/۷۹ ۰±/۱۵^{a}	۱۹/۵۰ ۰±/۴۰^{a}	۲۰^{a}
۱۱	۴۱/۳۴ ± ۰/۵۵^{d}	۴/۴۰ ۰±/۲۰^{b}	۱۸/۵۲ ۰±/۲۶^{b}	۲۰^{a}
۱۱/۵	۴۲/۲۳ ± ۱/۰۱^{c}	۳/۹۵ ۰±/۳۵^{c}	۱۷/۵۱ ۰±/۲۱^{c}	۱۵^{b}
۱۲	۴۳/۱۹ ± ۰/۵۹^{b}	۳/۶۲ ۰±/۱۴^{c}	۱۷/۴۲ ± ۰/۱۷^{c}	۲۰^{a}
۱۲/۵	۴۶/۲۸ ± ۰/۳۷^{a}	۳/۴۰ ۰±/۱۵^{d}	۱۶/۴۰ ۰±/۰۱^{d}	۲۰^{a}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($p < 0.05$).

آنالیز رنگ

ویژگی‌های رنگی (مقادیر L، a و b) تیمارهای مختلف پروتئین ایزوله ماهی در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج حاصله در ارتباط با شاخص رنگ، نشان داد که فاکتور L در پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲/۵ در مقدار ۴۶/۲۸ به شکل معنی‌داری افزایش یافت. با افزایش pH فاکتورa و b به تدریج از pH ۱۰/۵ به pH ۱۲/۵ کاهش یافت ($p < 0.05$).

ظرفیت تشکیل امولسیون و پایداری امولسیون

نتایج حاصل از بررسی ظرفیت تشکیل امولسیون پروتئین‌های ایزوله شده در جدول ۴ بیان شده است. نتایج نشان داد پروتئین ایزوله شده ۳۶/۷۲٪ در pH ۱۱/۵ ظرفیت تشکیل امولسیون بیشتری نسبت به سایر پروتئین‌های ایزوله داشت ($p < 0.05$). همچنین شاخص پایداری امولسیون در شرایط قلیایی ۳۸/۶۲٪ در pH ۱۱/۵ درصد بالاتری را به خود اختصاص داد.

جدول ۴: قدرت تشکیل امولسیون و پایداری امولسیون پروتئین‌های ایزوله شده در pH های قلیایی

pH	ظرفیت تشکیل امولسیون(ml/g)	پایداری امولسیون (ml/g)
۱۰/۵	۲۷/۳۲ ± ۰/۲۴^{e}	۲۹/۴۰ ± ۰/۲۳^{d}
۱۱	۳۰/۵۰ ± ۰/۲۷^{d}	۳۲/۲۰ ± ۰/۳۰^{c}
۱۱/۵	۳۶/۷۲ ± ۰/۸۱^{a}	۳۸/۶۲ ± ۰/۵۶^{a}
۱۲	۳۲/۳۳ ± ۰/۲۴^{b}	۳۴/۷۲ ± ۰/۳۵^{b}
۱۲/۵	۳۱/۴۱ ± ۰/۲۰^{c}	۳۲/۵۲ ± ۰/۳۳^{c}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($p < 0.05$).

ظرفیت نگهداری آب

ظرفیت حفظ آب پروتئین‌های ایزوله شده در pH های قلیایی در جدول ۵ آمده است. بررسی آماری نتایج حاکی از آن است که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت حفظ آب پروتئین‌ها وجود داشت و با افزایش pH ظرفیت حفظ آب پروتئین‌های ایزوله افزایش یافت. از بین ایزوله‌های پروتئینی، نمونه تهیه شده در pH ۱۱/۵ و ۱۲ به شکل معنی‌داری ظرفیت نگهداری آب بیشتری نسبت به پروتئین‌های ایزوله شده در سایر pH ها داشت ($p < 0.05$).

ظرفیت حفظ روغن

نتایج ظرفیت حفظ روغن پروتئین‌های ایزوله شده در pH های قلیایی در جدول ۵ آمده است. مطابق با نتایج ظرفیت حفظ روغن پروتئین‌های ایزوله شده در pH ۱۱/۵ نسبت به پروتئین ایزوله شده برتری داشت، اگرچه در سایر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p < 0.05$).

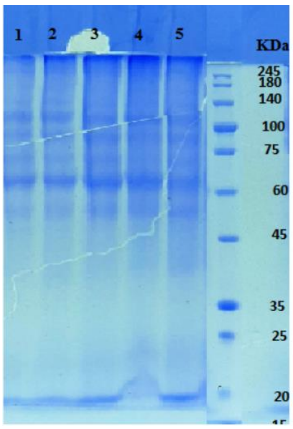
جدول ۵: میانگین ظرفیت حفظ آب و حفظ روغن پروتئین های ایزوله شده در pH های قلیایی

pH	ظرفیت حفظ آب (ml/g)	ظرفیت حفظ روغن (ml/g)
۱۰/۵	۱/۷۰ ± ۰/۲۸^{c}	۱/۸۹ ± ۰/۱۷^{c}
۱۱	۲/۱۴ ۰±/۱۳^{b}	۲/۴۲ ± ۰/۱۹^{b}
۱۱/۵	۳/۷۸ ± ۰/۳۵^{a}	۲/۹۴ ۰±/۳۶^{a}
۱۲	۲/۴۸ ۰±/۱۷^{b}	۲/۴۲ ۰±/۸۹^{b}
۱۲/۵	۱/۵۲ ۰±/۱۰^{c}	۱/۹۱ ± ۰/۳۰^{c}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($p < 0.05$).

سنجش وزن مولکولی

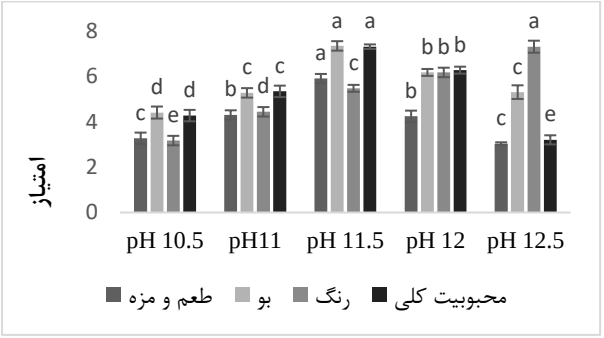
در شکل ۴ وزن مولکولی پروتئین‌های ایزوله در بازده‌های ۲۴۵ کیلو دالتون، ۱۸۰ کیلودالتون، ۱۴۰ کیلودالتون، ۱۰۰ کیلودالتون، ۷۵ کیلودالتون، ۶۰ کیلودالتون، ۴۵ کیلو دالتون، ۳۵ کیلودالتون، ۲۵ کیلودالتون، ۲۰ کیلودالتون، ۱۵ کیلودالتون، ۱۰ کیلودالتون و ۵ کیلودالتون طبقه بندی شد. در باند ۵که بیشترین میزان تجمع پروتئین مشاهده شد مختص به پروتئین ایزوله در pH ۱۱/۵ است که در این باند بیشترین میزان استخراج پروتئین نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد و هرچه به سمت وزن پایین‌تر می‌رود میزان پروتئین با وزن کم در این باند بیشتر شده است.



شکل ۴: ژل SDS-PAGE پروتئین ایزوله شده از سرماهی خاویاری سیبری با استفاده از روش ترکیبی قلیایی و فراصوت. pH ۱۲/۵ (۱)، pH ۱۲(۲)، pH ۱۰/۵ (۳)، pH ۱۱ (۴)، pH ۱۱/۵ (۵).

ارزیابی حسی

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود. نتایج ارزیابی حسی در pH ۱۱/۵ از لحاظ بو، طعم و مزه ویژگی حسی مطلوب تری داشت و از لحاظ محبوبیت امتیاز بیشتری توسط ارزیاب‌ها دریافت کرده است. از طرفی از لحاظ رنگ pH ۱۲/۵ امتیاز بالاتری را نشان داد ($p < 0.05$).



شکل ۵: ارزیابی حسی در پروتئین ایزوله شده از سرماهی خاویاری سیبری در pH های قلیایی

بحث

تحقیق حاضر میزان چربی پروتئین‌های ایزوله نسبت به چربی ضایعات چرخ شده کمتر بود، در جدول (۱) این کاهش چربی در تیمارهای قلیایی را می‌توان به فرآیند سانتریفیوژ در مرحله نخست و حذف چربی‌ها نسبت داد[25]. در واقع در pH های قلیایی، غشای سلولی از سطح پروتئین‌ها شکسته شده و در نتیجه لیپیدهای موجود در ضایعات براساس وجود اختلاف دانسیته و حلالیت در سانتریفیوژ جداسازی می‌شوند. همچنین کاهش میزان خاکستر نمونه‌ها در pH های قلیایی نیز حاکی از حذف ناخالصی‌ها در این روش است[20,19]. میزان پایین بازده استخراج تحقیق حاضر شکل (۱) احتمالا به دلیل رسوب مقدار قابل توجهی از پروتئین‌ها در مرحله اول سانتریفیوژ و از دست رفتن مقدار دیگری از آن‌ها در سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ مرحله دوم می باشد [21]. در بررسی تحقیقات صورت گرفته در سایرگونه‌ها بازده‌ی استخراج پروتئین از ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) در شرایط قلیایی به ترتیب ۷۹/۸٪[22] و ۷۹/۸۲٪[15] گزارش شد. با توجه به اینکه نوع گونه ماهی و توان سانتریفیوژ برمیزان بازده استخراج موثراست، می‌توان این گونه بیان کرد که نتایج به دست آمده پژوهش حاضر از نظر روند افزایش استخراج پروتئین در pH های بالا با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان مطابقت داشت. مطابق نتایج

به دست آمده در شکل (۱) بیشترین میزان حلالیت پروتئین ۸۳/۷۰ ٪ در pH ۱۱/۵به دست آمد. حلالیت پروتئین به عنوان مهمترین شاخص اندازه‌گیری ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها مطرح می‌باشد. دلیل این اهمیت، تاثیرگذاری حلالیت برسایر خواص مانند کف‌کنندگی، امولسیفایر وتشکیل ژل می‌باشد. حلالیت پروتئین در آب به چندین عامل از جمله ترکیب اسیدامینه آن‌ها، میزان pH، وزن مولکولی و وضعیت کنفورماسیونی آن بستگی دارد. همچنین حلالیت پروتئین‌ها کاملا تحت تاثیرpH قرار دارد به همین منظور افزایش حلالیت پروتئین‌ها در pH های قلیایی به دلیل افزایش بار مثبت یا بار منفی پروتئین‌ها است که در نتیجه با افزایش نیروی دافعه بین رشته‌های پروتئینی، منجر به افزایش حلالیت می‌شود [23,24]. الگوی حلالیت پروتئین‌های ماهی خاویاری سیبری مشابه مطالعات مربوط به سایر گونه‌های ماهی از جمله گربه ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) [21] ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) [25] ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) [26] ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) [27,15] و ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)،[22] بود. در جدول (۲) روش تغییر pH سبب افزایش میزان اسیدهای آمینه ضروری شد و نسبت به نمونه اولیه تفاوت هایی داشتند که می‌تواند مربوط به حذف ناخالصی‌های کلاژنی مانند استخوان و پوست باشد که حاوی مقادیر زیادی اسید آمینه‌های غیر ضروری از جمله گلیسین و پرولین است[28]. تمام اسیدهای امینه ضروری موجود در پروتئین‌های ایزوله بالاتر از میزان توصیه شده برای بزرگسالان براساس FAO/ WHO/UNU (۲۰۰۷) بود[29]. این نتایج با گزارش انجام شده در ماهی کاد (*Merluccius capensis*) که فقط در مقدار لیزین و ترئونین میزان مصرف بزرگسال را توصیه کرد که ارزش غذایی بیشتری را نشان می‌دهد، مطابقت داشت[30] . نتایج خاصیت کف‌کنندگی پروتئین‌های ایزوله نشان داد که pH ۱۱/۵ ظرفیت تشکیل کف پروتئین‌ها افزایش یافت. تشکیل کف توسط پروتئین‌ها بر اساس پراکنده شدن پروتئین‌های محلول در فضای آب و هوا است که بر اثر تغییر در ساختار پروتئین‌ها می‌باشد. با افزایش قلیائیت بار خالص پروتئین‌ها افزایش می‌یابد. در نتیجه پراکنده شدن پروتئین‌ها در سطح آب و هوا افزایش یافته و کف بیشتری تشکیل می‌شود[29]. در شکل (۲) مشاهده می‌گردد ظرفیت کف‌کنندگی پارامتری است که کاملا تحت تاثیر pH است. بیشترین میزان قابلیت کف‌کنندگی ۸۶/۴۱٪ در pH ۱۱/۵مشاهده شد. همانطور در شکل (۳) پایداری کف با بالا رفتن pH به ۱۱/۵ افزایش یافت[31]. که خواص ژل‌دهی پروتئین به دناتوره شدن جزئی پروتئین بستگی دارد[32]. خاصیت ژل‌دهی پروتئین به دناتوراسیون جزئی پروتئین بستگی دارد. همانطور که در جدول (۳) مشاهده شد در pH ۱۱/۵ تشکیل ژل در غلظت ۱۵٪ اتفاق افتاد که علت آن را می‌توان این گونه بیان کرد که تغییر pH و دناتوراسیون جزئی پروتئین باعث افزایش مناطق آبگریز شود و ساختار سه بعدی ژل ایجاد می شود. این نتیجه با نتایج Pezeshk و همکاران[7] بررسی خواص ژل دهی از پروتئین ایزوله ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به این نتیجه رسیدند که ژل‌دهی در pH قلیایی بیشتر بود، مطابقت داشت و همچنین با نتایج دیگر محققین نیز مشابه بوده است[33.34]. همانطور که در جدول (۳) مشاهده می‌شود افزایش میزان روشنایی نمونه‌ها (L) به حذف بسیاری از رنگدانه‌های تیره از قسمت‌های مختلف ماهی است[39]. فرآیند تغییر pH به روش قلیایی ۹۵٪ چربی اولیه‌ی ضایعات را کاهش داده و رسوب در نقطه ایزوالکتریک منجر به بازیافت پروتئین با خصوصیات رنگی بهتری می‌شود[27] . همانطور که در جدول (۴) مشاهده می‌گردد، ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین ایزوله ماهی خاویاری سیبری تابع تغییرات pH بود که این وابستگی به دلیل اثر pH بر تعادل هیدروفوب – هیدروفیل پروتئین می‌باشد. ظرفیت تشکیل امولسیون پروتئین‌ها به دلیل وجود هردو ناحیه‌ی آبدوست و آبگریز در ساختار پروتئین می‌باشد. این پروتئین‌ها در سطح بین فاز آب و روغن جذب شده از طریق فعل و انفعلات با هردو سطح سبب تثبیت آب و روغن می‌شود و از دو فاز شدن آن جلوگیری می‌کنند [7]. بیشترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی در pH ۱۱/۵ به میزان ۳۶٪/۷۲ حاصل شد. این یافته با نتایج بیان شده توسط Foh و همکاران [15] در تاثیر تغییر pH بر ویژگی های عملکردی پروتئین جدا شده از ماهیچه‌ی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) و پروتئین ایزوله سویا به این نتیجه رسیدند که ظرفیت امولسیون‌کنندگی وابسته به تغییر pH قلیایی است که بیشترین ظرفیت تشکیل امولسیون نسبت به روش اسیدی داشته است و مقدار آن ۷۰/۸۳٪ گزارش شد. ظرفیت نگهداری آب به حداکثر میزان آبی که مواد می‌توانند در فرمولاسیون غذایی جذب و نگهداری کنند گفته می‌شود[35]. در مواد غذایی مختلف به ترکیب اسیدهای آمینه، آرایش فضایی پروتئین، میزان آبدوستی و آبگریزی پروتئین و همچنین حضور کربوهیدرات‌های آبدوست بستگی دارد[36,37].

همانگونه که در نتایج مشاهده شد پروتئین ایزوله شده در جدول (۵) در pH ۱۱/۵ بیشترین میزان ظرفیت نگهداری آب را داشت و این ناشی از تغییراتی است که در ساختار پروتئین و گروه‌های باردار به وجود می‌آید که منجر به در سطح قرار گرفتن مناطق اتصال آب می‌شود که با افزایش قطبیت پروتئین، میزان اتصال با آب افزایش می‌یابد [15]. این یافته با نتایج بیان شده توسط Chomnawang و Yongsawatdigul بازیابی پروتئین از محصولات جانبی ماهی تیلاپیا به روش تغییر pH، به این نتیجه دست یافتند که در pH ۱۲ نسبت به روش اسیدی خواص عملکردی مطلوب تری داشت، مطابقت دارد[27]. بررسی نتایج حفظ روغن جدول (۵) پروتئین‌های ایزوله شده نشان داد که در pH ۱۱/۵ ظرفیت حفظ روغن به طور جزئی نسبت به سایر تیمارها افزایش داشته که ناشی از تغییرات در ساختار پروتئین‌ها در pH قلیایی است به طوری که گروه‌های آبگریز در سطح قرار می‌گیرند و سبب بهبود ظرفیت حفظ روغن می‌شوند[38]. نمونه‌های پروتئینی در pH قلیایی از وزن مولکولی ۲۴۵ کیلو دالتون تا ۴۵ کیلو دالتون در pH ۱۱/۵ (باند شماره ۵) رنگ ژل افزایش یافت که این نشان دهنده‌ی میزان بیشتر پروتئین استخراج شده در این تیمار می‌باشد. همچنین از وزن مولکولی ۴۵ تا ۱۵ کیلودالتون در باند شماره ۵ رنگ ژل نسبت به سایر تیمارها پر رنگ‌تر بوده است که نشان دهنده‌ی کاهش وزن مولکولی در pH ۱۱/۵ است که با نتایج حاصل از تحقیق Zhong و همکاران در پروتئین ایزوله شده از محصولات جانبی ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) با استفاده از انحلال و رسوب به روش قلیایی به این نتیجه دست یافتند که باندهای پروتئینی بیشتری در pH ۱۲ مشاهده شد که نسبت به سایر تیمارها مقدر بیشتری داشته است[18]. همانطور که در شکل (۵) مشاهده می‌شود در pH های قلیایی خواص حسی از نظر بو، رنگ و طعم و مزه در pH ۱۱/۵ بیشترین میزان محبوبیت از لحاظ بو و طعم و مزه را دارد و علت آن را می‌توان با توجه به میزان اسید آمینه‌های گلوتامیک اسید و آسپاراتیک اسید و همچنین به خواص عملکردی مطلوب‌تر آن دانست [40] افزایش این دو اسید امینه در نمونه‌ی پروتئینی منجر به بو، طعم و مزه مطلوب شده است.

نتیجه‌گیری

طبق گزارشات به دست آمده در مقایسه با استانداردهای WHO/ FAO/ UNU پروتئین ایزوله شده ماهی حاوی مقادیر مناسبی از اسید آمینه‌های ضروری به خصوص هیستیدین، ترئونین، متیونین، والین، فنیل آلانین، ایزولوسین، لوسین و لیزین است از این‌رو از پروتئین ایزوله به عنوان مکمل و مواد افزودنی در صنایع غذایی استفاده می‌شود. باتوجه به اینکه سوء تغذیه ناشی از کمبود پروتئین و انرژی از جمله مهم‌ترین مشکلات موجود در اغلب کشورهای در حال توسعه است لذا افزودن مقدار کنترل شده‌ای از پروتئین ماهی به غذای روزمره افرادی که دچار کمبود پروتئین هستند باعث رفع این نقیصه می‌شود. یکی از ساده‌ترین روش‌های استخراج پروتئین، روش قلیایی است که در این روش میزان بازده پروتئین، درصد حلالیت و خواص عملکردی پروتئین‌های ایزوله به طور معنی‌داری به تغییر pH به دلیل تغییر ساختاری که در پروتئین ایجاد شده است، بستگی دارد. با توجه به خصوصیات رنگی و حسی، پروتئین‌های ایزوله شده به روش قلیایی در pH ۱۱/۵ از لحاظ رنگ، بو، طعم و مزه و محبوبیت، امتیاز بیشتری در بین ارزیاب‌ها داشته است. بنابراین فرآیند تغییر pH می‌تواند به عنوان روشی کارآمد در جهت بازیابی پروتئین از سر تاس ماهی سیبری (*A.baerii*) مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و دانشگاه تربیت مدرس در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام میدارند هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سیده منا حسینی چوپانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳۳/۳٪)؛ مسعود رضائی (نویسنده دوم)، روش شناس/تحلیل‌گر آماری (۳۳/۳٪)؛ سمانه پزشک (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۳۳/۳٪).

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالیصندوق حمایت از پژوهشگران و دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع:

1. Aspevik, T., Totland, C., Lea, P., and Oterhals, Å. (2016). Sensory and surface-active properties of protein hydrolysates based on Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products. Process Biochemistry, 51(8), 1006-1014.
2. Surasani, V. K. R., Singh, A., Gupta, A., and Sharma, S. (2019). Functionality and cooking characteristics of pasta supplemented with protein isolate from pangas processing waste. LWT, 111, 443-448.
3. Lin, H., Deng, S., Zhang, B., and Pang, J. (2013). Separation, structure identification and antimicrobial activity of ferrous chelate of protein hydrolysate in hairtail (Hrichiurus Haumela). J. Sin. Mol. Res, 1, 2-6.
4. Surasani, V. K. R., Khatkar, S. K., and Singh, S. (2017). Effect of process variables on solubility and recovery yields of proteins from pangas (*Pangasius pangasius*) frames obtained by alkaline solubilization method: Characteristics of isolates. Food and bioproducts processing, 106, 137-146.
5. Islam, M., Yuhi, T., Ura, K., and Takagi, Y. (2020). Optimization of Extraction of Gelatin from the Head of Kalamtra Sturgeon (*Huso dauricus*× *Acipenser scherenkii*× *Acipenser transmontanus*). Applied Sciences, 10(19), 6660.
6. Tahergorabi, R., Matak, K. E., and Jaczynski, J. (2015). Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients. Journal of Functional Foods, 18, 746-756.
7. Pezeshk, S., Rezaei, M., Hosseini, H., and Abdollahi, M. (2021). Impact of pH-shift processing combined with ultrasonication on structural and functional properties of proteins isolated from rainbow trout by-products. Food Hydrocolloids, 118, 106768.
8. Abdollahi, M., and Undeland, I. (2018). Structural, functional, and sensorial properties of protein isolate produced from salmon, cod, and herring by-products. Food and Bioprocess Technology, 11, 1733–1749.
9. Cole, E. C., Rutala, W. A., Nessen, L., Wannamaker, N. S., and Weber, D. J. (1990). Effect of methodology, dilution, and exposure time on the tuberculocidal activity of glutaraldehyde-based disinfectants. Applied and environmental microbiology, 56(6), 1813-1817.
10. AOAC, Association of Official Analytical Chemists. (1990). Official methods of analysis (15th ed.) Washington: Arlington.
11. Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Analytical biochemistry, 87(1), 206-210.
12. Surasani, V. K. R. (2018). Acid and alkaline solubilization (pH shift) process: a better approach for the utilization of fish processing waste and by-products. Environmental Science and Pollution Research, 25(19), 18345-18363.
13. Xiong, T., Xiong, W., Ge, M., Xia, J., Li, B., and Chen, Y. (2018). Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate. Food Research International, 109, 260-267.
14. Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H., and Ghorbel, D. (2016). Effect of pH on the functional properties of Arthrospira (*Spirulina*) platensis protein isolate. Food Chemistry, 194, 1056-1063.
15. Abdollahi, M., and Undeland, I. (2018). Structural, functional, and sensorial properties of protein isolate produced from salmon, cod, and herring by-products. Food and bioprocess technology, 11(9), 1733-1749.
16. Foh, M. B. K., Wenshui, X., Amadou, I., and Jiang, Q. (2012). Influence of pH shift on functional properties of protein isolated of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscles and of soy protein isolate. Food and Bioprocess Technology, 5(6), 2192-2200.
17. Xi, C., Kang, N., Zhao, C., Liu, Y., Sun, Z., and Zhang, T. (2020). Effects of pH and different sugars on the structures and emulsification properties of whey protein isolate-sugar conjugates. Food Bioscience, 33, 100507.
18. Zhong, S., Liu, S., Cao, J., Chen, S., Wang, W., and Qin, X. (2016). Fish protein isolates recovered from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by-products using alkaline pH solubilization and precipitation. Journal of Aquatic Food Product Technology, 25(3), 400-413.

19. Chen, Y. C., Tou, J. C., and Jaczynski, J. (2007). Amino acid, fatty acid, and mineral profiles of materials recovered from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation. Journal of food science, 72(9), C527-C535.
20. Taskaya, L., Chen, Y. C., and Jaczynski, J. (2009). Functional properties of proteins recovered from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by isoelectric solubilization/precipitation. LWT-Food Science and Technology, 42(6), 1082-1089.
21. Kristinsson, H. G., Theodore, A. E., Demir, N., and Ingadottir, B. (2005). A comparative study between acid-and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. Journal of food science, 70(4), C298-C306.
22. Jafarpour, S. A., Shabanpour, B., and Shirvani Filabadi, S. (2013). Biochemical properties of fish protein isolate (FPI) from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by application of acid-alkali processes compared to traditional prepared surimi. Ecopersia, 1(3), 315-327.
23. Palafox, H., Cordova-Murueta, J. H., del Toro, M. A. N., and García-Carreño, F. L. (2009). Protein isolates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by pH-shift processing. Process Biochemistry, 44(5), 584-587.
24. Hultin, H. O., and Kelleher, S. D. (2000). Surimi processing from dark muscle fish. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-, 59-78.
25. Kristinsson, H. G., and Liang, Y. (2006). Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) muscle proteins. Journal of Food Science, 71(5), C304-C312.
26. Chen, W., Wang, W., Ma, X., Lv, R., Watharkar, R. B., Ding, T., ... and Liu, D. (2019). Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with epigallocatechin-3-gallate. Food chemistry, 274, 234-241.
27. Chomnawang, C., and Yongsawatdigul, J. (2013). Protein recovery of tilapia frame by-products by pH-shift method. Journal of Aquatic Food Product Technology, 22(2), 112-120.
28. Undeland, I., Kelleher, S. D., and Hultin, H. O. (2002). Recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) light muscle by an acid or alkaline solubilization process. Journal of agricultural and food chemistry, 50(25), 7371-7379.
29. WHO/FAO/UNC.(2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition World Health Organization technical report series, (935),1–265
30. de Jongh, H. H., and Broersen, K. (2012). Application potential of food protein modification. Advances in chemical engineering, 135-182.
31. Gao, J., Wang, Y., Yan, Y., Li, Z., and Chen, M. (2020). Protein extraction from excess sludge by alkali-thermal hydrolysis. Environmental Science and Pollution Research, 27(8), 8628-8637.
32. Resendiz-Vazquez, J. A., Ulloa, J. A., Urías-Silvas, J. E., Bautista-Rosales, P. U., Ramírez-Ramírez, J. C., Rosas-Ulloa, P., and González-Torres, L. (2017). Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. Ultrasonics Sonochemistry, 37, 436-444.
33. Kim, L., Rao, A. V., and Rao, L. G. (2003). Lycopene II—effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. Journal of medicinal food, 6(2), 79-86.
34. Park, Y. C., and Kim, J. S. (2012). Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. Energy, 47(1), 31-35.
35. Quinn, J. R., and Paton, D. (1979). A practical measurement of water hydration capacity of protein materials [Cereal food products]. Cereal Chemistry.
36. Chen, Y. C., and Jaczynski, J. (2007). Protein recovery from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing byproducts via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties as affected by functional additives. Journal of agricultural and food chemistry, 55(22), 9079-9088.
37. Seena, S., and Sridhar, K. R. (2005). Physicochemical, functional and cooking properties of under explored legumes, Canavalia of the southwest coast of India. Food Research International, 38(7), 803-814.

38. He, Z., Cao, H., Cheng, H. N., Zou, H., and Hunt, J. F. (2013). Effects of vigorous blending on yield and quality of protein isolates extracted from cottonseed and soy flours. Modern applied science, 7(10), 79.
39. Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., Khamsorn, S., Chaijan, M., and Benjakul, S. (2009). Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. Food Chemistry, 112(1), 112-119.
40. Zhong, L., Ma, N., Wu, Y., Zhao, L., Ma, G., Pei, F., and Hu, Q. (2019). Characterization and functional evaluation of oat protein isolate-Pleurotus ostreatus β-glucan conjugates formed via Maillard reaction. Food Hydrocolloids, 87, 459-469.

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume12, Issue 3, Summer 2023
Pages: 261-276

Using pH shift by alkaline technique in the production of isolated protein from the head of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*): Investigation of Chemical composition and functional properties

Seyedeh Mona Hosseini Choupani, Masoud Rezaei*, Samaneh Pezeshk

Seafood Processing Department, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

A B S T R A C T

The aim of this study was to produce protein isolates from the head of the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and study its functional and structural properties. Fish protein isolates were prepared by the pH shift method using alkaline pHs 10.5, 11, 11.5, 12, and 12.5. The results showed that the efficiency of protein extraction and its amount of essential amino acids at pH 11.5 were higher than other treatments. Furthermore, the results of determination of functional properties such as Water Holding Capacity, Oil Holding Capacity, emulsifying properties, foaming and solubility of the isolated proteins showed that as the pH increased, the functional properties improved and the protein isolates at pH 11.5 compared with other treatments was significantly higher ($p < 0.05$). Comparison of the color characteristics (L, a and b) of the isolated proteins showed at pH 12 were more bright (higher L parameter) than those isolated in other treatments tested. In addition, the amount of red (parameter a) and yellowness (parameter b) of the isolated proteins decreased with increasing pH. The results of the organoleptic examination of the smell and taste of protein isolates at pH 11.5 are the most common among other treatments. According to the observed cases, the results show that the resulting Siberian sturgeon isolate protein has favorable functional properties and that the use of alkaline pH changes can lead to improved functional properties and parameters of color protein isolates.

KEYWORDS: Functional properties - Isolated protein - Siberian sturgeon - PH shift

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 22 June 2023

Accepted: 23 July 2023

ePublished: 23 Aug 2023

* Corresponding Author:
Email address: rezai_ma@modares.ac.ir
Tel: +98 (11) 44553366
© Published by Tarbiat Modares University
ISSN: 2322-5513