

بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از عضله ماهی مرکب (Sepia pharaonis) خلیج فارس به روش سطح پاسخ

علی حمزه^۱، مسعود رضائی^{۲*}، صابر خدابنده^۳، علی معتمدزادگان^۴، 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
- ۴- 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: ۹۴/۱۱/۱۲

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

چکیده

pH

/

/

/

pH= / Design Expert

/

/

/

کلید واژگان: پروتئین هیدرولیز شده، ماهی مرکب ببری، آلکالاز، روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی

در سال ۲۰۱۲ میزان تولید آبزیان، متشکل از صید و آبزی پروری، ۱۵۸ میلیون تن بوده که از این مقدار فقط حدود ۱۳۶/۲ میلیون تن برای مصارف انسانی بود (FAO,

مقدمه

هیدرولیز اسیدی و قلیایی و هیدرولیز آنزیمی استفاده می‌شود. تخمیر میکروبی 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 اسید آمینه 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

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 زیست‌فعال 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 هیدرولیز شده مجموعه‌ای از پپتیدها (معمولاً با ۲ تا ۲۰ اسید آمینه) هستند که در اثر شکستن زنجیره‌های پروتئینی در نتیجه فرایندی تحت عنوان هیدرولیز به‌وجود می‌آیند. هیدرولیز پروتئین اجازه می‌دهد که نیتروژن بیشتر محلول 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) به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده شامل تخمیر میکروبی، هیدرولیز شیمیایی متشکل از

این تحقیق امکان تولید و دستیابی به شرایط بهینه برای عملکرد آنزیم آلکالاز از نظر pH، دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا برای تولید پروتئین آبکافت از این گونه است.

مواد و روش کار

مواد مورد استفاده

آنزیم آلکالاز با فعالیت ۲/۴ واحد آنسون بر گرم و با کد P4860 از شرکت سیگما، تری کلرواستیک اسید از شرکت پانراک و آلومین سرم گاوی^۱، اتانول، اسید فسفریک و کوماسی بلو از شرکت مرک خریداری شد. ماهی مرکب ببری با وزن 243 ± 130.4 گرم از سواحل بندرعباس صید شده و بلافاصله در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با حمل هوایی به ساری و سپس در محفظه‌های حاوی یخ به دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. عضله ماهیان (۳۹۳/۴±۷۸ گرم) در آزمایشگاه جدا شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بهینه‌سازی

از روش سطح پاسخ و در قالب طرح مرکب مرکزی^۲ و با استفاده از نرم افزار Design expert نسخه ۷ برای بهینه‌سازی شرایط آبکافت از نظر pH، دما، زمان و نسبت آنزیم به عضله استفاده شد (جدول ۱). در این طرح از ۵ سطح برای هر تیمار استفاده و مقدار آلفا نیز برابر ۲ در نظر گرفته شد.

پروتئین با درجه بالای آبکافت در کوتاه ترین زمان و در شرایط متعادل نسبت به آنزیم های خنثی یا اسیدی به‌طورگسترده استفاده می‌شود. در روند تولید پروتئین آبکافت بسته به ویژگی های خود آنزیم، شرایط محیطی و میزان آبکافت تنوع گسترده‌ای از پپتیدها با وزن مولکولی متفاوت به دست خواهد آمد. پروتئین آبکافت شده به دست آمده به دلیل وجود پپتیدهای جدید خواص کاربردی نوینی خواهد داشت (Thiansilakul et al, 2007)

شرایط هیدرولیز بر خواص پروتئین هیدرولیز شده اثر می‌گذارد، به‌طورکلی به‌نظر می‌رسد که پپتیدهای با طول زنجیره کوتاه‌تر نسبت به پروتئین‌های با زنجیره بزرگ‌تر و همچنین اسیدهای آمینه آزاد خواص بهتری دارند اما با این وجود، ساختار، طول زنجیره و توالی اسید آمینه به عوامل مختلفی نظیر شرایط هیدرولیز، دما، غلظت آنزیم، زمان، pH و ماده زمینه‌ای بستگی دارد (Benjakul et al, 2014).

ماهی مرکب با صید جهانی حدود ۳ میلیون تن در هر سال از جمله گونه‌هایی است که به میزان بسیاری همراه با صید ضمنی به‌دست می‌آید (FAO, 2011). در ایران نیز هر ساله حجم زیادی از ماهی مرکب از آب‌های خلیج فارس به‌وسیله صیادان به‌طور مستقیم و یا ضمنی همراه با صید میگو به‌دست می‌آید ولی در کشور علاقه‌ای به مصرف مستقیم این آبی 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 دیگر، و از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای درباره تولید پروتئین هیدرولیز شده از این گونه گزارش نشده است، هدف از

1. BSA

2. Central composite rotatable design

جدول ۱ عوامل و شرایط مورد استفاده در طرح بهینه‌سازی

محدوده و سطوح (کد)					عوامل	
+α (+۲)	+۱	۰	-۱	-α (-۲)	نشانه	
۹	۸/۵۰	۸	۷/۵۰	۷	A	pH
۶۰	۵۵	۵۰	۴۵	۴۰	B	دما (°C)
۱۸۰	۱۵۰	۱۲۰	۹۰	۶۰	C	زمان (دقیقه)
۳	۲/۵۰	۲	۱/۵۰	۱	D	آنزیم (درصد)

تولید پروتئین هیدرولیز شده

نمونه‌های منجمد به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) گذاشته شد تا انجمادزدایی صورت گیرد. نمونه‌ها با استفاده از چرخ گوشت با منافذی به قطر ۲ میلی‌متر چرخ شده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد (در حمام آبی) قرار گرفته تا آنزیم‌های درونی آن غیرفعال شوند. به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده، ابتدا ۲۰ گرم از نمونه‌های چرخ شده در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته می‌شوند. سپس میزان ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و به مدت 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)، به منظور 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، به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ (مدل 320 R universal، 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 به هم زدن در دمای ۲۰ درجه با دور ۶۷۰۰ 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)

TCA

×۱۰۰

معادله ۱:

$$\text{درجه آبکافت} = \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

اندازه‌گیری 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 زمانی که 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) فیلتر شده تا ذرات معلق و نامحلول جدا شود. محلول به دست 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 بردفورد 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 ۴ فاکتور در ۵ سطح و با عدد آلفا برابر ۲ و ۶ نقطه مرکزی تعداد ۳۰ تیمار را برای بهینه‌سازی سازماندهی کرد. درجه هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ۳۰ تیمار از طریق معادله ۱ محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۲ آمده است. درجه هیدرولیز از ۲۰/۴۸ تا ۴۳/۱۵ درصد متغیر بود.

جدول ۲ طرح مرکب مرکزی (CCRD) در روش پاسخ سطح با ۴ متغیر مستقل و ۶ نقطه مرکزی برای بهینه‌سازی تولید پروتئین آبکافت از عضله ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) خلیج فارس 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 (-)	۴۵ (-)	۹۰ (-)	۱/۵ (-)	۲۱/۴
۲	۸/۵ (+)	۴۵ (-)	۹۰ (-)	۱/۵ (-)	۲۵/۵۱
۳	۷/۵ (-)	۵۵ (+)	۹۰ (-)	۱/۵ (-)	۲۵/۳۶
۴	۸/۵ (+)	۵۵ (+)	۹۰ (-)	۱/۵ (-)	۲۸/۶۱
۵	۷/۵ (-)	۴۵ (-)	۱۵۰ (+)	۱/۵ (-)	۲۴/۰۸
۶	۸/۵ (+)	۴۵ (-)	۱۵۰ (+)	۱/۵ (-)	۲۶/۷۵
۷	۷/۵ (-)	۵۵ (+)	۱۵۰ (+)	۱/۵ (-)	۲۹/۵۲
۸	۸/۵ (+)	۵۵ (+)	۱۵۰ (+)	۱/۵ (-)	۲۹/۰۱
۹	۷/۵ (-)	۴۵ (-)	۹۰ (-)	۲/۵ (+)	۲۸/۱۸
۱۰	۸/۵ (+)	۴۵ (-)	۹۰ (-)	۲/۵ (+)	۳۱/۷
۱۱	۷/۵ (-)	۵۵ (+)	۹۰ (-)	۲/۵ (+)	۲۵/۵۸
۱۲	۸/۵ (+)	۵۵ (+)	۹۰ (-)	۲/۵ (+)	۳۲/۲۳

ادامه جدول

۲۸/۳۱	(+) ۲/۵	(+) ۱۵۰	(-) ۴۵	(-) ۷/۵	۱۳
۳۴/۹	(+) ۲/۵	(+) ۱۵۰	(-) ۴۵	(+) ۸/۵	۱۴
۲۵/۵۸	(+) ۲/۵	(+) ۱۵۰	(+) ۵۵	(-) ۷/۵	۱۵
۳۲/۵۲	(+) ۲/۵	(+) ۱۵۰	(+) ۵۵	(+) ۸/۵	۱۶
۲۷/۷۹	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(-) ۲	۱۷
۳۴/۸۶	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(+) ۹	۱۸
۲۰/۴۸	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(-) ۴۰	(۰) ۸	۱۹
۲۷/۴۷	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(+) ۶۰	(۰) ۸	۲۰
۳۴/۳۳	(۰) ۲	(-) ۶۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۱
۴۰/۲۵	(۰) ۲	(+) ۱۸۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۲
۲۴/۲	(-) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۳
۳۲/۶۷	(+) ۳	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۴
۴۱/۸۶	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۵
۳۸/۳۹	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۶
۴۰/۴	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۷
۴۳/۱۵	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۸
۴۰/۸۹	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۲۹
۴۲/۳۱	(۰) ۲	(۰) ۱۲۰	(۰) ۵۰	(۰) ۸	۳۰

معناداری برای pH بیشتر از بقیه فاکتورها بود و به دنبال آن به ترتیب 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.

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

جدول ۳ آنالیز واریانس درجه آبکافت تحت تأثیر ۴ متغیر مستقل در طرح مرکب مرکزی (CCRD) روش پاسخ سطح (RSM) برای مدل درجه ۲

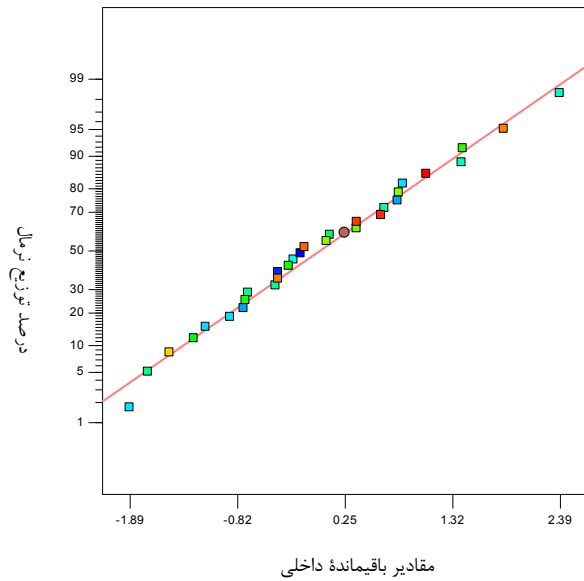
عوامل	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	شاخص F	P
مدل	۱۴	۱۱۸۸/۸۶	۸۴/۹۲	۲۰/۳۸	< ۰/۰۰۰۱ ***
فاکتورهای مستقل					
pH-A	۱	۹۳/۴۶	۹۳/۴۶	۲۲/۴۲	۰/۰۰۰۳ ***
B-دما	۱	۱۹/۳۷	۱۹/۳۷	۴/۶۵	۰/۰۴۷۷ *
C-زمان	۱	۲۳/۸۸	۲۳/۸۸	۵/۷۳	۰/۰۳۰۲ *

ادامه جدول					
۰/۰۰۰۴ ***	۲۰/۸۸	۸۷/۰۲	۸۷/۰۲	۱	D-نسبت آنزیم به عضله
اثر متقابل فاکتورها					
۰/۹۴۶۲	۰/۰۴۷	۰/۰۲۰	۰/۰۲۰	۱	AB
۰/۸۲۴۸	۰/۰۵۱	۰/۰۲۱	۰/۰۲۱	۱	AC
۰/۱۰۳۰	۳/۰۲	۱۲/۵۷	۱۲/۵۷	۱	AD
۰/۸۷۲۹	۰/۰۸۶	۰/۰۳۶	۰/۰۳۶	۱	BC
۰/۰۱۶۹ *	۷/۲۲	۳۰/۰۹	۳۰/۰۹	۱	BD
۰/۵۶۰۶	۰/۰۳۵	۱/۴۸	۱/۴۸	۱	CD
توان دوم					
< ۰/۰۰۰۱ ***	۵۲/۴۷	۲۱۸/۶۷	۲۱۸/۶۷	۱	A ²
< ۰/۰۰۰۱ ***	۱۴۲/۹۸	۵۹۵/۸۹	۵۹۵/۸۹	۱	B ²
۰/۰۰۳۸ **	۱۱/۶۸	۴۸/۶۹	۴۸/۶۹	۱	C ²
< ۰/۰۰۰۱ ***	۸۲/۷۶	۳۴۴/۹۰	۳۴۴/۹۰	۱	D ²
--	--	۴/۱۷	۶۲/۵۱	۱۵	Residue error
۰/۲۸۶۳	۱/۷۲	۴/۸۴	۴۸/۴۲	۱۰	نبود تناسب
		۲/۸۲	۱۴/۱۰	۵	خطای خالص
--	--	--	۱۲۵۱/۳۷	۲۹	تصحیح کلی
				۰/۹۵	R ²
				۰/۹۰۳۴	Adjusted R ²
				۰/۷۶۰۹	Predicted R ²
				۱۴/۱۶۰	Adeq Precision

***P<۰/۰۰۱,** P<۰/۰۱,* P<۰/۰۵

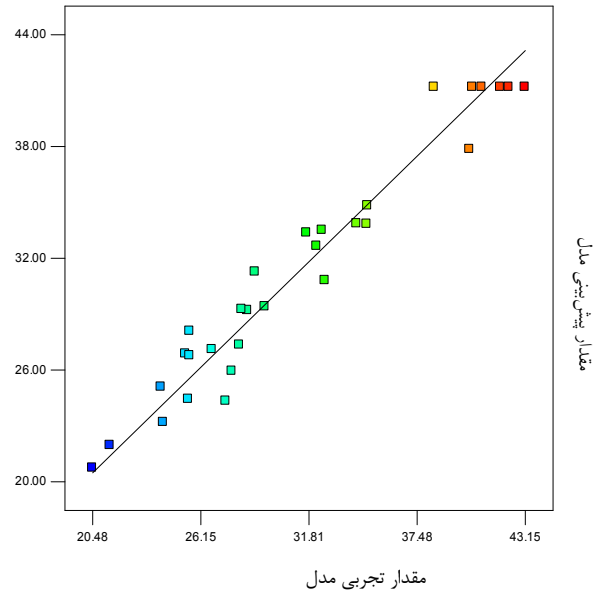
همان‌طور که در جدول ۳ آمده است، میزان ضریب تعیین کلی برابر ۰/۹۵ و نسبت سیگنال به اختلال^۱ ۱۴/۱۶ بود. شکل ۱ نیز نشان‌دهنده توزیع احتمال نرمال داده‌ها و مقایسه نتایج حاصل از تخمین مدل و نتایج واقعی است.

1. Adeq Precision



مقادیر باقیمانده داخلی

ب



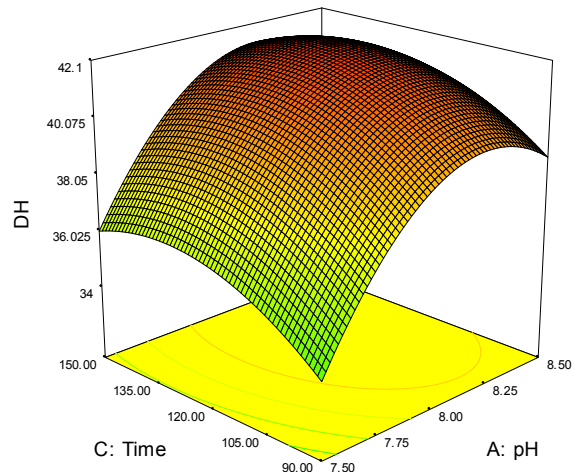
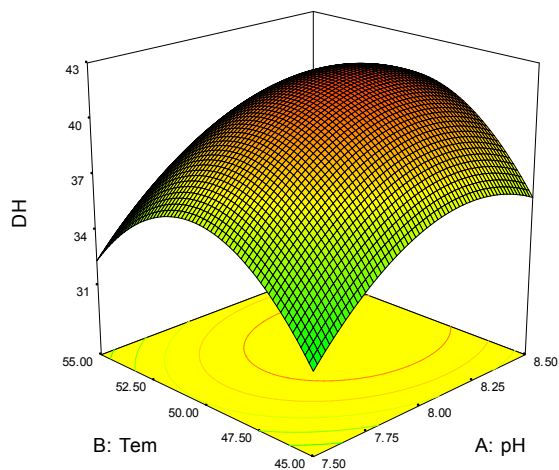
مقدار تجربی مدل

الف

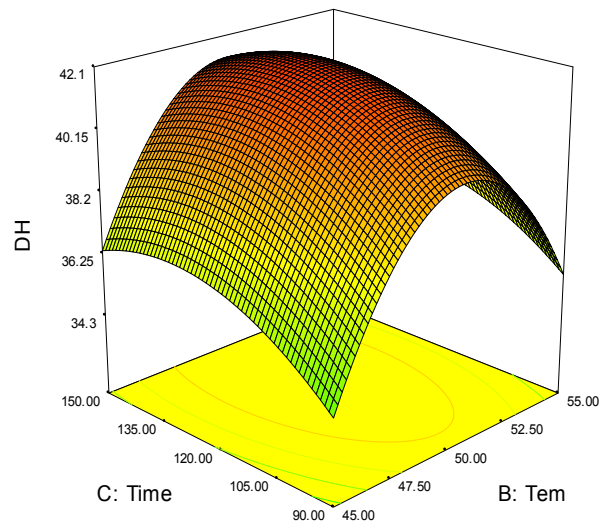
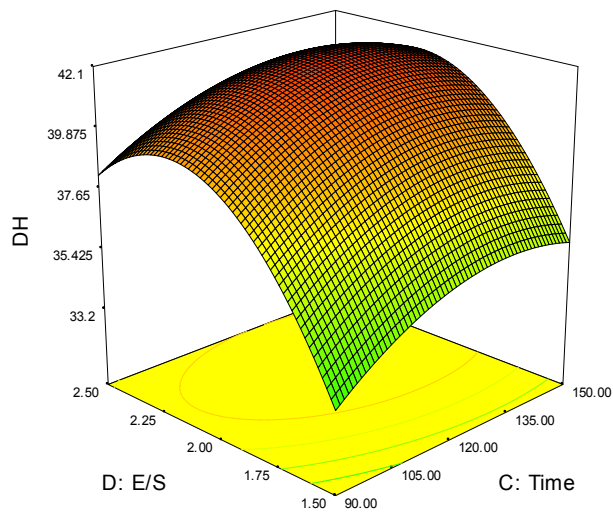
شکل ۱ مقایسه مقدار پیش‌بینی مدل در برابر مقدار تجربی (الف) و توزیع احتمال نرمال (ب)

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.

در شکل ۲ اثرهای متقابل بین فاکتورها در مدل به صورت ۳ بعدی آمده است. همان‌طور که در نمودار آمده است، افزایش میزان دما تا حد خاصی (در محدوده نقاط مرکزی) باعث افزایش میزان درجه هیدرولیز می‌شود و پس از آن با افزایش دما روند نمودار به سمت کاهش پیش



شکل ۲ اثرهای متقابل بین فاکتورها در مدل به صورت ۳ بعدی



$$DH = 41.17 + 0.97A + C + 1/9D - 1/37BD - 2/82A^2 - 4/66B^2 - 1/33C^2 - 3/55D^2$$
 با استفاده از نرم‌افزار Design Expert شرایط بهینه برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی مرکب ببری به دست آمده و در جدول ۴ نمایان شد.

بهینه‌سازی و معادله رگرسیونی

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

جدول ۴ شرایط بهینه و پیش‌بینی درجه هیدرولیز به وسیله مدل در شرایط بهینه

پیش‌بینی پاسخ		شرایط بهینه			
مطلوبیت	درجه هیدرولیز (درصد)	غلظت (درصد)	زمان (دقیقه)	دما (°C)	pH
۰/۹۵	۴۲/۰۱۱۷	۲/۱۵	۱۲۹/۶۲	۵۰/۲۳	۸/۱۹

بحث

ارزیابی مدل

را به اندازه کافی توضیح دهد (طاهری و همکاران، ۱۳۹۱). شاخص‌های مربوط به ارزیابی کارایی مدل بیانگر کفایت مدل برای پیش‌بینی پاسخ است.

شکل ۱- الف، مقایسه داده‌های به دست آمده (مقادیر تجربی) و داده‌های پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. براساس توضیحات نرم‌افزار، وجود یک تناسب که با زاویه ۴۵ درجه نسبت به محورها مشخص شده، ارتباط خوب بین آنها را نشان می‌دهد.

شکل ۱- ب، نشان‌دهنده 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 نشان‌دهنده تناسب میان مقادیر تجربی و مقادیری است که توسط مدل پیش‌بینی شده است.

درجه هیدرولیز

مدل خطی برای ۴ فاکتور زمان، دما، غلظت (نسبت آنزیم به سوسترا) و pH نشان می‌دهد که هر کدام از متغیرها به تنهایی بر درجه هیدرولیز اثر معناداری دارند. با افزایش میزان هر یک از فاکتورها تا محدوده نقطه مرکزی، میزان درجه هیدرولیز افزایش یافت اما پس از آن، با افزایش دما و غلظت، میزان درجه هیدرولیز کاهش یافت و با افزایش زمان و pH میزان درجه هیدرولیز روند ثابتی را از خود نشان داد.

ضریب تعیین واقعی^۱، ضریب تعیین تعدیل شده^۲، نبود برازش^۳ برای ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار 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 به ترتیب برابر ۰/۹۵ و ۰/۹۰۳۴ بود. همچنین هرچه ضریب تعیین تعدیل شده به ضریب تعیین واقعی نزدیک‌تر باشد، بهتر است. ضریب تعیین برابر ۰/۹۵ نشان‌دهنده این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۹۵ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست 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 به دست آمده میزان آن برابر ۱۴/۱۶ می‌باشد. میزان این شاخص اگر بالاتر از ۴ باشد مطلوب است.

فقدان برازش برای مدل معنادار نبود ($p > 0/05$) و این نشان‌دهنده این است که مدل ایجاد شده توانسته تغییرات

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

همان‌طور که در جدول ۲ مشخص شده است، بیشترین میزان درجه هیدرولیز در این مطالعه (۴۳/۱۵ درصد) در نقطه مرکزی یعنی در دمای ۵۰ درجه 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 درجه هیدرولیز از ماهی سالمون (*Salmo salar*) را به ترتیب ۵۵/۳ درجه سانتی‌گراد و ۸/۳۹ گزارش کردند. Taheri و همکاران (۲۰۱۱) نیز دما و pH بهینه برای آنزیم آلکالاز به‌منظور هیدرولیز ماهی ساردین پهلوی (*Sardinella gibbosa*) را به ترتیب ۴۵/۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۸/۵ گزارش کردند. Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) دما و pH بهینه این آنزیم را برای هیدرولیز امعا و احشای فیل ماهی (*Huso huso*) به ترتیب ۵۰ درجه و ۸/۵ گزارش کردند. Normah و همکاران (۲۰۰۵) برای سیم‌باله نخعی دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۸/۵ و Benjakul و Morissey (۱۹۹۷) برای ماهی *Merluccius productus* دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۹/۵ را گزارش کردند.

بر اساس 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 ماده 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 نقطه مرکزی میزان درجه هیدرولیز افزایش یافت، اما پس از آن میزان درجه هیدرولیز کاهش یافت. الگوی مشابهی نیز در پروتئین هیدرولیز شده امعا و احشای فیل ماهی (Ovissipour et al, 2009) و ماهی تن

همان‌طور که در بالا اشاره شد، با افزایش غلظت آنزیم تا حدود نقطه مرکزی میزان درجه هیدرولیز افزایش یافت، اما پس از آن میزان درجه هیدرولیز کاهش یافت. الگوی مشابهی نیز در پروتئین هیدرولیز شده امعا و احشای فیل ماهی (Ovissipour et al, 2009) و ماهی تن

نتیجه‌گیری کلی

هیدرولیز پروتئین‌ها یکی از روش‌های مؤثر و مفید برای تبدیل گونه‌های کم‌مصرف و یا ضایعات آبیان به فرآورده‌هایی با ارزش افزوده 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 بهینه 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

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 functional properties. Critical Review in Food 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 the production of threadfin bream (*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., Esmaili 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 Alcalase 2.4L by response surface methodology. CyTA - Journal of Food, 9: 114-120.

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

نشان داد که مدل حاضر از تناسب و اطمینان خوبی به منظور پیش‌بینی درجه هیدرولیز عضله ماهی مرکب با استفاده از آنزیم آلكالاز 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 from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 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 utilizing 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 Nadiyah., 2013. Optimizing the Enzymatic Hydrolysis of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Dark Flesh Using Alcalase[®] Enzyme: A Response

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. (Abstract in English)

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

Ali Hamzeh¹, Masoud Rezaei^{2*}, Saber khodabandeh³, Ali Motamedzadegan⁴, Mehrdad Norozinia⁵

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 $\alpha=2$ 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 $R^2 = 0.95$, 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 enzyme 2.15%.

Keywords: Cuttlefish, Hydrolysate, RSM, Alcalase, CCRD