

## ارزیابی خصوصیات فیزیوشیمیایی و قابلیت تشکیل ژل پروتئین ایزوله بازیافتی از ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) کامل و تخلیه شکمی شده به روش تغییر pH

مهدی عبدالهی<sup>۱</sup>، مسعود رضائی<sup>۲\*</sup>، سید علی جعفرپور<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه فرآوری آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

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

۳- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۹/۰۲

\*نویسنده مسئول مقاله: rezai\_ma@modares.ac.ir

### چکیده:

تحقیق حاضر بمنظور ارزیابی کارایی روش تغییر pH در دو حالت اسیدی و قلیایی جهت بازیافت پروتئین از ماهی کیلکای کامل و تخلیه شکمی شده و نیز مقایسه ویژگی های سوریمی تولیدی با روش متداول شستشو انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که اگر چه هر دو روش اسیدی و قلیایی موجب کاهش میزان رنگدانه کل در پروتئین ایزوله بازیافتی از ماهی کامل و تخلیه شکمی شده گردید اما کارایی روش قلیایی به مراتب بیشتر بود و کمترین میزان رنگدانه در پروتئین ایزوله قلیایی کیلکای تخلیه شکمی شده مشاهده گردید. ایزوله بازیافتی از ماهی تخلیه شکمی شده به روش قلیایی کمترین میزان پپتیدهای محلول در TCA را نشان دادند که بطور معنی داری از سایر نمونه ها کمتر بود ( $p < 0.05$ ). همچنین ژل تولیدی از ایزوله قلیایی کیلکای تخلیه شکمی شده بطور معنی داری ظرفیت نگهداری آب (۶۳/۴۵٪) و سختی (۳/۵۱ نیوتن) بالاتری نسبت به نمونه های کیلکای کامل و نمونه های اسیدی داشتند ( $p < 0.05$ )، اما از سوریمی عضله کیلکا (ظرفیت نگهداری آب ۷۴/۵۴٪ و سختی ژل ۴/۸۹ نیوتن) ضعیف تر بودند. این نتایج با مشاهده مقادیر نسبی بیشتر اکتومیوزین و اکتین در ساختار ژل سوریمی عضله و ایزوله قلیایی ماهی تخلیه شکمی شده بر اساس الگوی وزن مولکولی حاصل از الکتروفورز پروتئین تایید گردید. با این وجود نمونه های حاصل از روش تغییر pH در مورد هر دو منبع سفیدی بسیار پایین تری نسبت به سوریمی عضله کیلکای معمولی داشتند که لزوم تحقیقات بیشتر در زمینه بهبود خواص آن را آشکار می سازد.

### کلید واژگان: ماهی کیلکا، پروتئین ایزوله، روش تغییر pH، سوریمی

#### مقدمه

مصرف ماهی و فرآورده های آبزیان بدلیل وجود اسیدهای چرب چند غیر اشباع، پروتئین با کیفیت بالا و اسیدهای آمینه ضروری و همچنین اثرات آنها بر سلامت انسان در سرتاسر جهان روبه افزایش است (Mohan و همکاران، ۲۰۱۲). بطوری که سرانه مصرف آبزیان از ۹/۹ کیلوگرم در دهه ۱۹۶۰ به ۱۸/۸ کیلوگرم در سال ۲۰۱۱ در جهان و ۱۰/۲ کیلوگرم در ایران افزایش یافته است و متوسط رشد سالانه ۳/۲٪ را طی این دوره نشان می دهد (FAO، ۲۰۱۲). از سوی دیگر اگرچه مجموع تولیدات آبزیان در جهان به ۱۵۴ میلیون تن رسیده است اما تولید از طریق صید روند ثابت و یا حتی نزولی را طی سالهای اخیر تجربه می کند. این در حالی است که از مجموع تولید جهانی حدود ۳۰٪ مستقیماً به عنوان صید ضمنی بوده و از دسترس خارج می شود (FAO، ۲۰۱۲). از مجموع ۱۳۰ میلیون تنی که به عنوان محصول قابل مصرف به جمعیت ۷ میلیاردی جهان عرضه می شود، بیش از ۵۰٪ آن طی فرآوری به صورت محصولات جانبی از دسترس خارج می شود، به گونه ای که طی فرآوری برخی از گونه های سخت پوستان مانند کریل تا ۹۰٪ و طی تولید فیله ماهی می تواند تا ۷۰-۶۰٪ پسماند یا فرآورده های جانبی تولید گردد (Torres, 2007).

همانطور که آمارهای ارائه شده نشان می دهد میزان گونه های کم مصرف و زائدات بسیار زیاد است. بطور همزمان صید بی رویه<sup>۱</sup>، تحلیل رفتن ذخایر، و دیگر مسائل زیست محیطی مرتبط با فرآوری آبزیان روز به روز بیشتر در جوامع بشری مورد توجه قرار می گیرد زیرا جمعیت جهان افزایش می یابد درحالیکه منابع دریایی قابل مصرف

افزایش نمی یابد (Gehring et al., 2011). بنابراین تامین نیاز بشر به پروتئین از منابع دریایی در آینده دشوار به نظر می رسد. در این حالت دو راهکار تمرکز هرچه بیشتر بر آبری پروری و گونه های پرورشی و نیز فناوری های بازیافت جدیدتر و کارآمدتر جهت افزایش قابلیت استفاده بهینه از گونه های کم مصرف و کاهش زائدات فرآوری پیشرو قرار دارد (Nolsoe and Undeland, 2009).

همانطور که بیان شد برخی از گونه های آبزیان کم مصرف نامیده می شوند که بدین معنی است که این گونه ها می توانند بیشتر مورد مصرف انسانی قرار بگیرند. این ماهیان عمدتاً سطح زیان کوچک را شامل می شود که بصورت گله ای زندگی می کنند و در حجم انبوه یافت می شوند. این گونه های کم مصرف که عمدتاً شامل کیلکا، شگ ماهیان، و ماکرل ها می باشند؛ همگی جزو پرتولید-ترین گونه های دنیا بحساب می آیند. این سطح زیان ریز حدود ۲۳٪ از کل صید دنیا را به خود اختصاص می دهند که تنها ۴۲٪ آنها به مصرف انسانی می رسد (FAO, 2012). میزان تولید جهانی آنها در سال ۲۰۱۱ مطابق آمار فائو نزدیک به ۲۰ میلیون تن بوده است که صید کیلکا در آبهای شمال ایران ۲۰۷۱۷ تن در سال ۱۳۹۰ می باشد که بخش اعظم آن جهت تولید آرد و روغن ماهی استفاده می شود (Statistics Fisheries Annual Iran, 2011). فرآوری این گونه ها عمدتاً بدلیل اندازه کوچک و دشواری فیله کردن آنها، وجود مقادیر زیاد استخوان های ریز، وجود مقادیر زیاد عضلات تیره، چربی بالا (معمولاً با نوسانات فصلی زیاد) و حساس به اکسیداسیون، مقادیر زیاد پروتئین های هم<sup>۲</sup> که منجر به مشکل رنگ و فساد چربی در آنها می شود با محدودیت های فراوانی روبروست (Kelleher et

#### 1. Overfishing

#### 2. Heme

زائاداتی مانند سر، گوشت اسکلت و حتی موجود کامل مانند کریل و یا ماهی تخلیه شکمی شده را فراهم می سازد (Chen and Jaczynski, 2007). این روش نسبت به سوریمی این مزیت را دارد که می تواند جهت مواد اولیه پیچیده مانند ماهی کامل و زائادات استفاده شود. در مقایسه با آرد ماهی و پروتئین هیدرولیز شده نیز این مزیت را دارد که محصول نهایی حاوی پروتئین های کامل با خواص کارکردی است که می تواند برای کاربردهای غذایی و تولید محصولات بازسازی شده و نیز مبتنی بر سوریمی استفاده شود.

با این وجود تاکنون گزارشی در زمینه استفاده از روش تغییر pH جهت بازیافت پروتئین از ماهی کیلکای معمولی کامل و یا تخلیه شکمی شده بعنوان یک سطح زی ریز و مقایسه آن با سوریمی بازیافتی به روش سنتی از این گونه وجود ندارد. بنابراین تحقیق حاضر بمنظور ارزیابی کارایی روش تغییر pH در دو حالت اسیدی و قلیایی جهت بازیافت پروتئین از ماهی کیلکای کامل و تخلیه شکمی شده و نیز مقایسه ویژگی های سوریمی تولیدی با این روش و روش سنتی انجام پذیرفت.

#### مواد و روش ها

##### تهیه و آماده سازی ماهی

ماهی کیلکای معمولی صید شده از آبهای دریای خزر در بندر بابلسر بصورت تازه از کشتی های صیادی خریداری و به سرعت در مجاورت یخ به آزمایشگاه فرآوری دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. سپس بخشی از آن بصورت کامل و بخش دیگر پس از تخلیه شکمی منجمد گردید. نمونه ها تا زمان استخراج پروتئین ایزوله در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

##### ارزیابی حلالیت و بازده پروتئین طی فرآیند تغییر pH

(al., 2004). علی رغم همه این مشکلات به دلیل کاهش منابع ماهیان تجاری با ارزش بالا تلاش های گسترده ای جهت کاربرد آنها جهت استخراج، تخلیص پروتئین و نیز تولید سوریمی از آنها در حال انجام می باشد.

اگرچه فناوری سوریمی فرصت ارزشمندی جهت تبدیل گونه های آبی کمی مصرف مختلف به محصولات با ارزش تجاری بالا را فراهم می سازد. با این وجود تکنولوژی سنتی عمل آوری سوریمی در استفاده از مواد خام غیر متعارف مانند سطح زیان چرب تاحدودی بدلیل وفور چربی های ناپایدار در برابر اکسیداسیون و بسیاری از پراکسیدان ها (مخصوصا پروتئین های هم) که منجر به مشکلات رنگ و اکسیداسیون می شود چندان موفق ظاهر نشده است. بیشتر تلاش ها جهت تولید سوریمی از مواد دارای مقادیر زیاد عضلات تیره منجر به تولید محصول با خواص ژلی ضعیف و مشکلات عدیده ای در زمینه رنگ و اکسیداسیون چربی شده است. جدا سازی بخش های نامطلوب از این مواد مانند استخوان، فلس، پوست و چربی از پروتئین های مطلوب عضله نیز با مشکلات فراوانی روبرو شده است (Hultin et al., 2005).

به منظور حل معضل استفاده از مواد خام نامتعارف (ماهیان با عضله تیره و ماهیان چرب) و نیز استفاده از زائادات صنعت فرآوری آبزیان (مانند خرده گوشت ها، سر و گوشت های متصل به ستون فقرات و ...) فرآیندی با نام تغییر pH جهت تولید اقتصادی پروتئین ایزوله کارکردی از این نوع مواد ابداع گردید (Shaviklo, 2006). بر خلاف فناوری سوریمی روش تغییر pH یا ایزوالکتریک امکان استفاده از ماهیان کم ارزش سطح زی (Marmon et al., 2012; Batista et al., 2007; Tahergorabi et al., 2015; Perez-Mateos and Lanier, 2005; Yeung and kim, 2006) مانند ساردین، ماکرل، هرینگ و منهدن اطلس و نیز

جهت تعیین حلالیت پروتئین و بازده استخراج کیلکای تخلیه شکمی شده در pH های مختلف طی فرآیند تغییر pH و یافتن شرایط بهینه انحلال و ترسیب، مطابق روش (Undeland et al., 2002) عمل شد. کیلکای چرخ شده به نسبت ۱ به ۶ با آب دیونایز (از پیش سرد شده) ترکیب و بمدت ۲ دقیقه با کمک هموژنایز (Wiggen Hauser, Model D500, Germany) با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه همگن سازی شد. سپس مخلوط حاصل به دو قسمت تقسیم و یک بخش آن برای رساندن pH تا ۱۲ و بخش دیگر جهت کاهش pH تا ۱/۵ به ترتیب به کمک اسید کلریدریک و سود (۱۰ و ۱ نرمال) با دستگاه pH متر با دقت ۰/۰۰۱ واحد (Jenwey, Model 3510, England)، استفاده شد. در حین تغییر pH نمونه هایی جهت سنجش میزان پروتئین محلول در فواصل ۰/۵ واحد pH برداشته می شد. سپس نمونه ها با کمک تیوپ های ۸۵ میلی لیتری برای مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ میزان پروتئین محلول در لایه میانی به کمک روش اصلاح شده لوری توسط (Markwell et al., 1978) سنجش و میزان بازده کل پروتئین در لایه میانی به کمک موازنه جرمی محاسبه گردید. برای تعیین میزان پروتئین در روش لوری از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده گردید. درصد پروتئین محلول با تقسیم کل پروتئین موجود در لایه میانی بر میزان کل پروتئین در مخلوط ابتدایی پیش از سانتریفیوژ محاسبه گردید. لازم به ذکر است که پس از سانتریفیوژ سه لایه تشکیل گردید که لایه شناور بالایی چربی، لایه میانی پروتئین ها محلول و لایه پایینی یا رسوبات شامل استخوان، پوست و فلس بود که لایه میانی برای تخلیص پروتئین استفاده گردید.

۱۰۰ × (غلظت پروتئین در مخلوط ابتدایی) (mg/ml) / غلظت پروتئین در لایه میانی (mg/ml) = حلالیت پروتئین

### تولید پروتئین ایزوله و سوریمی

جهت استخراج پروتئین ایزوله ماهیان کامل و تخلیه شکمی شده پس از انجماد زدایی به مدت ۶-۷ ساعت در یخچال بصورت کامل به کمک چرخ گوشت با اندازه چشمه ۳ میلیمتر چرخ شد و پس از مخلوط کردن جداگانه با آب به نسبت ۱ به ۶ (ماهی چرخ شده به آب) به کمک هموژنایز (با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه) همگن سازی گردید. در ادامه پروتئین های میوفیبریلی در مخلوط حاصل در دو ناحیه اسیدی و قلیایی به ترتیب به کمک اسید کلریدریک و سود (۱۰ و ۱ نرمال) به حالت محلول در آمده (pH هدف ۲/۵ و ۱۱/۵) و پس از نگهداری در این حالت برای مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفیوژ (Hettich, Germany) در ۸۰۰۰g، دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ فاز وسط بعنوان پروتئین ایزوله حاوی پروتئین های میوفیبریلی و سارکوپلاسمی از لایه رویی شامل چربی و لایه پایینی حاوی مواد نامحلول شامل پوست، فلس و استخوان جداسازی گردید. در ادامه پروتئین محلول با رساندن pH آن به نقطه ایزوالکتریک (۵/۵) رسوب داده شده و با سانتریفیوژ (۸۰۰۰g، ۴ درجه سانتی گراد و ۲۰ دقیقه) جداسازی گردید (Tazakaya et al., 2009).

جهت تولید سوریمی با روش مرسوم شستشو از روش توضیح داده شده توسط (Chanarat and Benjakul, 2013) استفاده شد. به این منظور مینس<sup>۳</sup> از فیله بدون پوست و استخوان ماهی کیلکا (پوست گیری و استخوان گیری به صورت دستی) به نسبت ۱ به ۳ (وزنی/وزنی) با آب مقطر

رنگدانه کل با کمک روش (Hornsey 1956) سنجش گردید. به همین منظور ۲ گرم از نمونه با ۹ میلی لیتر از اسید استون (۹۰٪ استون، ۸٪ آب مقطر و ۲٪ HCL) مخلوط شد. نمونه توسط یک میله شیشه ای هم زده و بمدت ۱ ساعت در دمای محیط بی حرکت نگهداری شد. سپس عصاره با کاغذ صافی شماره ۱ فیلتر و در ۶۴۰ نانومتر جذب آن در برابر اسید استون بعنوان شاهد خوانده شد. رنگدانه کل بعنوان هماتین به کمک رابطه زیر محاسبه گردید.

رنگدانه کل = جذب در نانومتر ۶۴۰ × عدد ثابت ۶۸۰

**اندازه گیری پپتید های محلول در تری کلرواستیک اسید**  
میزان پپتیدهای محلول در تری کلرواستیک اسید (TCA) نشان دهنده میزان تخریب پروتئین ها در اثر پرتولیز طی حرارت دهی می باشد. ۲ گرم از نمونه ژل ریز شده و ۱۸ میلی لیتر TCA ۵٪ با هم ترکیب و با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm هموژنایز گردید. مخلوط حاصل بمدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شده و سپس بمدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. میزان پپتید محلول در TCA موجود در مایع شناور سطحی باروش لوری سنجش و برحسب میکرومول تیروزین در گرم نمونه بیان شد (Panpipat et al., 2010).

#### سنجش ظرفیت نگهداری آب

ظرفیت نگهداری آب مطابق توصیف Cardoso et al. (2010) اندازه گیری شد. نمونه ریز شده ژل (۲ گرم) در دو لایه کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (وزن شده) پیچیده و در یک لوله سانتریفیوژ قرار داده شد و با سرعت ۳۰۰۰ g برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ نمونه جدا شده و کاغذ صافی مجدداً وزن شد. ظرفیت نگهداری آب بر اساس فرمول زیر برحسب گرم آب در نمونه پس از

سرد (۴ درجه سانتی گراد) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه هم زده و پس از بی حرکت ماندن برای مدت ۳ دقیقه با پارچه نظیف دولایه فیلتر گردید. فرایند شستشو سه بار تکرار و در نهایت میزان ۰/۲ درصد نمک جهت آبیگری بهتر در شستشوی آخر به آب اضافه و آبیگری انجام شد.

سپس میزان ۲٪ ساکاروز و ۲٪ سوربیتول به عنوان محافظت کننده سرمایی به نمونه ها افزوده شد و پس از مخلوط کردن به مدت ۱ دقیقه و رساندن pH نمونه ها به ۷ به کمک سود ۲ نرمال در دمای ۱۸- در کیسه های پلاستیکی منجمد و نگهداری شدند. نمونه ها ظرف مدت کمتر از یک ماه جهت ارزیابی ویژگی های پروتئین ایزوله و ژل مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### آماده سازی ژل

جهت آماده سازی ژل از سوریمی تولید شده روش (Chaijan et al. 2010) استفاده گردید. ابتدا نمونه های منجمد شده برای مدت ۷ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجماد زدایی گردیدند. سپس نمونه ها به قطعات کوچک ریز شده<sup>۴</sup> و در همزن مولینکس برای مدت ۱ دقیقه پودر و سپس رطوبت آنها از طریق افزودن یخ در حال ذوب شدن به ۸۰ درصد رسانده شد. به منظور انحلال پروتئین میزان ۲ درصد نمک اضافه و همزدن بمدت ۲ دقیقه ادامه یافت. سپس نمونه ها به درون لوله های استیل زد زنگ با قطر ۱/۵ سانتی وارد و دو طرف آنها محکم بسته و درزبندی شد. پس از پخت در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ دقیقه جهت توقف پخت لوله ها به سرعت به ظرف یخ منتقل شد و پس از ۳۰ دقیقه نمونه ها خارج و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا برای انجام آزمون ها آماده گردد.

#### سنجش میزان رنگدانه کل

4. Chopped sample

سانتریفیوژ در ۱۰۰ گرم آب اولیه موجود در نمونه محاسبه و بیان گردید.

ظرفیت نگهداری آب = وزن اولیه نمونه × (درصد رطوبت/۱۰۰) - (وزن ثانویه کاغذ-وزن اولیه کاغذ)/وزن اولیه نمونه × (درصد رطوبت/۱۰۰)

### تجزیه تحلیل پروفیل بافت

خواص بافتی ژل سوریمی به کمک دستگاه آنالیز بافت (TexVol, Swiss) و از طریق انجام آزمون تجزیه تحلیل پروفیل بافت (TPA) در دمای محیط ارزیابی گردید. به همین منظور نمونه های ژل دو ساعت قبل از انجام آزمون از یخچال خارج و بصورت سیلندری شکل با ارتفاع ۱/۵ سانتی متر آماده سازی شد. انجام آزمون TPA با پروب مسطح به قطر ۴۰ میلیمتر و با سرعت ۶۰ میلیمتر در ثانیه طی دو مرحله فشرده گردید.

### سنجش رنگ ژل

شاخص های سفیدی و تغییر رنگ نمونه ها ژل سوریمی به کمک دستگاه رنگ سنج (IMG-Pardazesh Cam-system XI, Iran) از طریق سنجش شاخص های L (روشنایی)، a (قرمزی و سبزی) و b (زردی و آبی) مطابق توضیحات (Chaijan et al. 2010) سنجش می گردد و دو شاخص سفیدی به کمک فرمول مربوطه محاسبه گردید.

$$\text{سفیدی} = [100 - (100 - L)^2 + a^2 + b^2]^{0.5}$$

### الکتروفورز پروتئین

الگوهای پروتئینی ژل های تولیدی از پروتئین ایزوله بازیافتی به روش تغییر pH و روش سنتی طبق روش (Laemli 1970) با اصلاحات اندکی مورد مطالعه قرار گرفتند. به همین منظور، ۲۷ میلی لیتر محلول SDS ۰.۵٪ به ۳ گرم نمونه افزوده شد و به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه هموژنایز گردید. مخلوط های بدست آمده سپس در دمای ۸۵°C به مدت یک ساعت حرارت-

دهی شدند تا پروتئین بطور کامل حل شود. سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق مورد سانتریفیوژ (g × ۳۵۰۰) قرار گرفتند تا مواد نامحلول جدا گردد. نمونه های حل شده به نسبت ۱:۱ (v/v) با بافر نمونه (۱٪ SDS، ۴٪ ۲-مرکاپتواتانول، ۲۴٪ گلیسرول، ۰/۰۲٪ بروموفنول بلو، ۰/۱ Tric-HCl مولار با ۶/۸ pH) ترکیب شدند. پس از ترکیب با بافر نمونه نیز دوباره در دمای ۱۰۰°C به مدت ۵ دقیقه حرارت دهی شدند و در نهایت ۱۵ میکریتر از نمونه های آماده سازی شده و هم چنین ۵ میکرولیتر از مارکر (استاندارد) بر روی ژل پلی اکریلامید حاوی ژل جداکننده ۱۰٪ و ژل ردیف کننده ۴٪ بارگذاری شدند. ولتاژ ابتدایی روی ۵۰mv تنظیم شد اما پس از ورود نمونه ها به ژل پایین، به ۱۱۰mv افزایش و تا پایان نیز در همین سطح نگه داشته شد. الکتروفورز تا زمانی که رنگ به انتهای شیشه رسید ادامه پیدا کرد. پس از به پایان رسیدن الکتروفورز، با احتیاط کامل ژل از شیشه ها جدا و به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول رنگ آمیزی (۰/۰۲۵٪ بریلینت بلو، ۴۵٪ متانول، ۱۰٪ اسید استیک) قرار داده شد. رنگبری نیز با قرار دادن ژل در محلول رنگبری (۰/۴۰٪ متانول، ۱۰٪ اسید استیک) به مدت ۱۵ دقیقه صورت پذیرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها در قالب طرح کامل تصادفی انجام گردید. ابتدا از نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک (Shapiro-Wilk) اطمینان حاصل شد و سپس همگنی واریانس داده ها با آزمون لون (Leven) بررسی گردید. در نهایت جهت مقایسه آماری تیمار های مختلف از تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) در قالب آزمون دانکن جهت مقایسه چندگانه میانگین ها

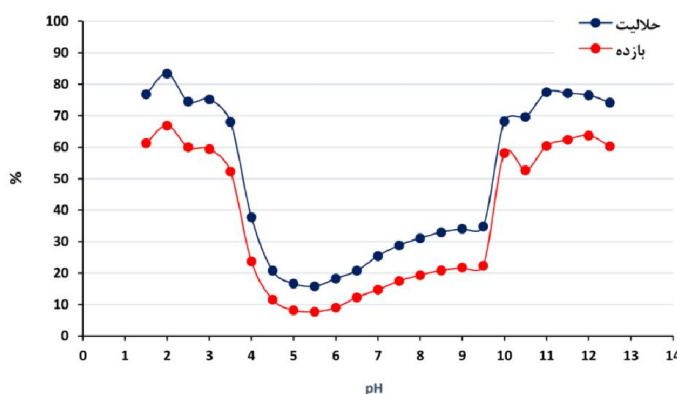
شکل ۱ نشان داده شده است. از آنجایی که در مطالعات قبلی (Marmon, 2013) نشان داده شده بود که وجود آنزیم های فراوان در هنگام استفاده از ماهی کامل ممکن است بر حلالیت پروتئین در طی فرآیند تغییر pH و متعاقبا بازده موثر باشد بنابراین برای یافتن pH بهینه انحلال و ترسیب پروتئین در ماهی کیلکا از ماهی تخلیه شکمی شده استفاده شد.

استفاده شد. تمامی آزمون ها حداقل با سه تکرار انجام پذیرفت و در مورد آزمون تجزیه و تحلیل پروفیل بافت از پنج تکرار استفاده گردید.

## نتایج و بحث

### حلالیت و بازده پروتئین طی فرآیند تغییر pH

نتایج مربوط به حلالیت پروتئین ماهی کیلکای تخلیه شکمی شده و بازده استخراج در pH های مختلف در



شکل ۱ حلالیت و بازده استخراج پروتئین طی فرآیند تغییر pH ماهی کیلکای معمولی تخلیه شکمی شده

بازیافت پروتئین در pH های مختلف مشاهده گردید به گونه ای که حداکثر بازده بازیافت پروتئین در pH های ۱۲ و ۲ مشاهده گردید. این حلالیت و بازده بالا در pH های شدید مربوط به افزایش بارهای مثبت و منفی پروتئین عضله به ترتیب در pH های پایین و بالا می باشد که منجر به دفعه الکترواستاتیک بین پروتئین ها می گردد. همچنین کمترین بازیافت در pH ۵/۵ (۷٪) مشاهده گردید که نشانگر نقطه ایزوالکتریک متوسط پروتئین های عضله می باشد (Kristinsson et al., 2010).

همچنین بازده پروتئین در ناحیه قلیایی ۶۳-۶۰ درصد و در ناحیه اسیدی ۶۱-۶۶ درصد بود. بطور مشابهی Marmon and Undeland (2010) میزان بازده پروتئین

همانطور که مشاهده میشود با افزایش pH در ناحیه قلیایی نسبت به pH خنثی میزان حلالیت به طور ملایمی افزایش یافت اما با رسیدن به pH ۱۰ حلالیت پروتئینی به طور قابل ملاحظه ای افزایش پیدا کرد. با افزایش بیشتر قدرت قلیایی محیط حلالیت پروتئین به حداکثر مقدار خود در pH های ۱۱ و ۱۱/۵ حدود ۷۷-۷۰٪ رسید. در ناحیه اسیدی با کاهش pH حلالیت ابتدا بطور ملایمی کاهش یافت و به کمترین مقدار خود در pH ۵/۵ رسید و مجدداً با افزایش قدرت اسیدی محیط افزایش یافت تا اینکه پس از یک افزایش شدید در pH ۳ حداکثر حلالیت در pH ۲ (۸۵-۷۵٪) بدست آمد. میزان حلالیت پروتئین در ناحیه اسیدی بالاتر از ناحیه قلیایی بود. روند مشابهی نیز در مورد

برای ماهی هرینگ (*Clupea harengus*) تخلیه شکمی شده به ترتیب در حالت قلیایی و قلیایی  $57/3 \pm 2/5$  و  $59/3 \pm 3/0$  گزارش کردند. همچنین نتایج مشابهی در مورد ماهی فیتوفاگ تخلیه شکمی شده ( $60/0$ ) (Tazakaya et al., 2009) گزارش گردیده است. اما بازده حاصل بالاتر از مقادیر گزارش شده در مورد کریل کامل ( $45-50$ ) (Chen و همکاران، 2009) و ضایعات ماهی قزل آلا ( $90-80$ ) (Chen and Jaczynski, 2007) می باشد. همچنین بازده پروتئین گزارش شده به مراتب کمتر از مقادیر گزارش شده برای منابع با پیچیدگی کمتر مانند فیله یا عضلات سفید در مورد ماهی هرینگ ( $74/0$ ) و گربه ماهی ( $71/5$ ) می باشد. این تفاوت ها می تواند به دلیل وجود مقادیر متفاوت بافت پیوندی (Kristinsson et al., 2005) و پروتئین های سارکوپلاسمی در گونه ها و نمونه های مختلف باشد که به ترتیب طی سانتریفیوژ اول رسوب کرده و یا طی سانتریفیوژ دوم بصورت جزئی بازیافت می گردد و نیز ممکن است به دلیل تفاوت در روش سنجش بازده نیز بوده باشد (Tazakaya et al., 2009). بنابراین جهت حصول حداکثر بازده پروتئینی و حداقل اثرات مخرب در شدت بالای قلیائیت و اسیدیته، pH های  $11/5$  و  $2/5$  جهت بازیافت به ترتیب در ناحیه قلیایی و اسیدی و pH  $5/5$  جهت ترسیب پروتئین در مراحل بعدی انتخاب گردید.

#### رنگدانه کل، پپتیدهای محلول در TCA و ظرفیت نگهداری آب

نتایج مربوط به رنگدانه کل موجود در ژل حاصل از گوشت چرخ شده، سوریمی و پروتئین ایزوله ماهی کیلکا در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین میزان رنگدانه در ژل تولیدی از گوشت چرخ شده ( $23/88 \text{ mg}/100\text{g}$ ) ( $1292/31$ ) مشاهده شد که میزان آن در ژل سوریمی

( $37/25 \pm 604/25 \text{ mg}/100\text{g}$ ) بیش از  $50\%$  کاهش یافت که نشان گر حذف بخش زیادی از رنگدانه های هم (هموگلوبین و میوگلوبین) طی فرآیند شستشو می باشد. این دو محصول از فیله ماهی کیلکا تهیه شده بودند که بخش اعظم عضلات تیره نیز طی فرآیند تهیه فیله از آنها جدا شده بود. رنگدانه های موجود در عضله تازه چرخ شده ماهی عمدتاً شامل دو دسته هموگلوبین و میوگلوبین هستند که طی نگهداری و فرآوری می توانند به سرعت به سایر اشکال آنها مانند مت هموگلوبین و مت میوگلوبین، همی کروم و ... تبدیل شوند. در حالت کلی این ترکیبات از دو منظر در فرآورده های شیلاتی می توانند نقش منفی ایفا کنند. هر دو این ترکیبات به دلیل دارا بودن حلقه هم و نیز آهن در مرکز ساختار پورفیرن میتوانند بوسیله مکانیسم های خاصی موجب اکسیداسیون چربی شوند. همچنین هر دو ترکیب به دلیل دارا بودن رنگ قرمز قادر هستند به طور نامطلوبی موجب ایجاد رنگ قرمز یا قهوه ای در فرآورده نهایی شوند (Chaigan and Undeland, 2015). در مورد پروتئین ایزوله مقادیر رنگدانه کل اگرچه در ایزوله حاصل از ماهی کامل در هر دو حالت قلیایی و اسیدی بیشتر از ماهی تخلیه شکمی شده بود اما باز هم بطور معنی داری کمتر از مینس بود ( $p < 0/05$ ). این امر نشانگر موفقیت فرآیند تغییر pH در حذف رنگدانه های هم طی سانتریفیوژ اول و دوم است اگر چه کارایی این فرآیند کمتر از فرآیند شستشو در سوریمی می باشد. مقادیر رنگدانه کل در هر دو شکل استفاده از ماهی کامل و تخلیه شکمی شده برای ایزوله قلیایی بطور معنی داری کمتر از ایزوله بدست آمده به روش اسیدی بود که نشانگر حذف بهتر رنگدانه ها طی فرآیند قلیایی می باشد ( $p < 0/05$ ). Kristinsson et al. (2005) نشان دادند که به دلیل دناتورده شدن شدید طی فرآیند اسیدی بخش زیادی از پروتئین های سارکوپلاسمی



تواند مقادیر کمتر رنگدانه کل در ایزوله حاصل از فرآیند قلیایی را توضیح دهد. سایر تحقیقات نیز مقادیر کمتری از میوگلوبین و رنگدانه کل را در ایزوله حاصل از روش قلیایی برای ماهی ماکرل، ساردین (Chaijan et al., 2006) و تیلپیا (Rawdkuen et al., 2009) گزارش دادند.

پس از بازگشت به نقطه ایزوالکتریک همراه با پروتئین های موفیبریلی رسوب می کنند. در حالیکه در فرآیند قلیایی بدلیل تخریب کمتر بخش زیادی از پروتئین های سارکوپلاسمی از جمله پروتئین های هم پس از بازگشت به نقطه ایزوالکتریک شناور باقی می ماند که این امر می

جدول ۱ رنگدانه کل، پپتیدهای محلول در TCA و ظرفیت نگهداری آب در ژل تولیدی از مینس، سوریمی و پروتئین ایزوله

ظرفیت نگهداری آب (%)	پپتیدهای محلول در TCA (mole ) ( $\mu$ tyrosine/g)	رنگدانه کل (mg/100g)	
$66/65 \pm 1/32^b$	$3/62 \pm 0/14^a$	$1292/31 \pm 23/88^a$	مینس
$74/54 \pm 1/14^a$	$2/37 \pm 0/21^c$	$604/25 \pm 37/25^c$	سوریمی
$58/50 \pm 1/44^d$	$1/62 \pm 0/11^d$	$865/26 \pm 44/09^b$	ایزوله قلیایی ماهی کامل
$55/65 \pm 1/36^d$	$2/84 \pm 0/23^b$	$1127/38 \pm 56/32^a$	ایزوله اسیدی ماهی کامل
$63/45 \pm 1/09^b$	$1/15 \pm 0/12^d$	$632/40 \pm 21/09^c$	ایزوله قلیایی-تخلیه شکمی
$60/12 \pm 1/23^c$	$2/02 \pm 0/18^c$	$894/20 \pm 35/35^b$	ایزوله اسیدی-تخلیه شکمی

\* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار ( $p < 0/05$ ) می باشد.

شده در ژل های حاصل از ماهی کامل نسبت به ماهی تخلیه شکمی شده ممکن است به دلیل هیدرولیز آنزیمی ناشی از بقایای آنزیمی مربوط به حضور احشاء بوده و نیز مقادیر بالاتر در ژل های حاصل از فرآیند اسیدی می تواند به دلیل هیدرولیز اسیدی پروتئین ها بخصوص پروتئین های میوفیبریلی باشد. (Rawdkuen et al., 2009) نیز بالاترین مقادیر بالاتری از پپتیدهای محلول در TCA را در ژل های حاصل از فرآیند اسیدی تغییر pH در ماهی تیلپیا گزارش نمودند.

ظرفیت نگهداری آب در فرآورده های آبزیان چه از نظر اثری که بر بازده محصول دارد و چه از نظر ارتباط مستقیم با خواص کارکردی و حسی محصول از اهمیتی ویژه برخوردار می باشد. همانطور که جدول ۱ نشان داده شده است بیشترین میزان ظرفیت نگهداری آب در ژل حاصل از سوریمی به روش شستشو و پس از آن ایزوله

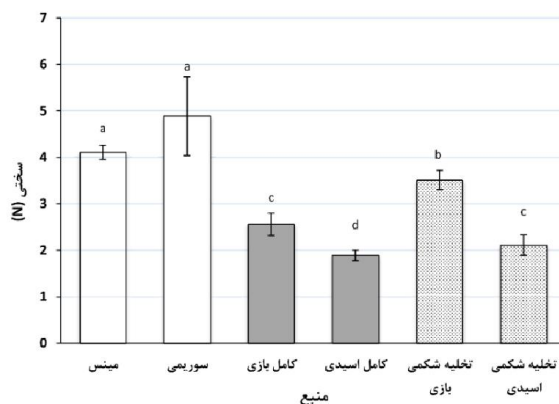
مقادیر پپتیدهای محلول در TCA بسته به نوع منبع و روش استفاده شده بطور قابل ملاحظه ای تغییر نمود. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است بیشترین میزان این پپتیدها در ژل حاصل از مینس ( mole )  $3/62 \mu$ tyrosine/g و ایزوله اسیدی ماهی کامل ( mole )  $2/84 \mu$ tyrosine/g و کمترین آن در ایزوله قلیایی حاصل از ماهی تخلیه شکمی شده ( $1/15 \mu$ mole tyrosine/g) مشاهده گردید. مقادیر پپتیدهای محلول در TCA نشانگر تخریب پروتئین و شکسته شدن آن در اثر هیدرولیز آنزیمی و یا اسیدی می باشد. علت مقادیر بالاتر مشاهده شده در ژل مربوط به مینس ممکن است به دلیل بالا بودن مقادیر آنزیم ها در مینس باشد که موجب هیدولیز پروتئین و نهایتا بالا بودن پپتیدهای محلول آن گردیده است در حالیکه این آنزیم ها طی شستشو از سوریمی حذف می شوند. همچنین مقادیر بالاتر پپتیدهای محلول در TCA مشاهده

همچنین در ایزوله حاصل از روش اسیدی نسبت به روش قلیایی در ماهی ماکرل و ساردین گزارش نمودند.

### خواص بافتی

سختی و سایر خصوصیات بافتی ژل شامل بهم پیوستگی، چسبندگی، صمغی بودن و قابلیت جویدن به ترتیب در شکل ۲ و جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین میزان سختی یا قدرت ژلی در نمونه های ژل سوریمی (۴/۸۹ نیوتن) و سپس مینس (۴/۱۹ نیوتن) مشاهده گردید که می تواند به دلیل تهیه این دو از فیله بدون استخوان و فاقد عضلات تیره باشد که به مراتب دارای مقادیر بیشتری از پروتئین های میوفیبریلی بوده و نهایتاً پس از حرارت دهی شبکه اکتومیوزینی یکپارچه تر و بهم پیوسته تری را ایجاد کرده است (Chanarat and Benjakul, 2013).

قلیایی حاصل از ماهی تخلیه شکمی شده بود و کمترین مقدار در ایزوله حاصل از فرایند اسیدی ماهی کامل و تخلیه شکمی شده بود. مقادیر بالاتر ظرفیت نگهداری آب در ژل حاصل از فرآیند شستشو می تواند بدلیل حذف بهتر رنگدانه و پروتئین های سارکوپلاسمی و نهایتاً خلوص بیشتر پروتئین های میوفیبریلی جهت پیوند با آب و نگهداری آن و تشکیل شبکه ژل منسجم تر باشد (Chaijan et al., 2010) و مقادیر کمتر مشاهده شده در ایزوله اسیدی نیز ممکن است بدلیل دناتورده شدن جزئی اما بیشتر پروتئین ها و در معرض قرار گرفتن آمینو اسید های هیدروفوب باشد که می توانند موجب کاهش ظرفیت نگهداری آب در ساختار ژل گردد. (Chaijan et al. (2006) نیز مقادیر کمتری از ظرفیت نگهداری آب را در ژل های حاصل از فرآیند تغییر pH نسبت به روش شستشو و



شکل ۲ سختی ژل تولیدی از مینس، سوریمی و پروتئین ایزوله طی آزمون تجزیه تحلیل پروفیل بافت. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۹۵٪ می باشد.

ژلی بالاتری داشتند در حالیکه نمونه های اسیدی در هر دو منبع سختی کمتری نشان دادند. وجود مقادیر زیاد رنگدانه، پروتئین های سارکوپلاسمی و مهمتر از همه آنزیم های پروتئولیتیک با فعالیت بالا که بخوبی در مورد ماهی کیلکا

در مورد قدرت ژلی نمونه های پروتئین ایزوله سختی متاثر از هر دو عامل منشا و روش مورد استفاده بود بگونه ای که نمونه های تولیدی از ماهی تخلیه شکمی شده در هر دو حالت اسیدی و باری نسبت به ماهی کامل قدرت

pH های بسیار پایین باشد که پس از بازگشت به ناحیه خنثی به طور کامل برگشت پذیر نیست (Kristinsson et al., 2005). قدرت ژلی بالاتر در ژل تولیدی از ایزوله حاصل از فرآیند قلیایی به طور گسترده ای در سایر گونه ها مانند عضله صخره ماهی (Yongsawatdigul and Park, 2004)، تیلایپا (Chanarat and Rawdkuen et al., 2009) و فیتوفاگ (Benjakul, 2013) و فیتوفاگ تخلیه شکمی شده (Chen et al., 2007) گزارش شده است. مقادیر بسیار بالاتر میوزین و اکتین در نمونه های ژل تولیدی از ایزوله ماهی تخلیه شکمی شده و نیز نمونه های حاصل از فرآیند قلیایی در ژل الکتروفورز که بصورت بانده های پر رنگ تر در ۲۰۵ و ۴۵ کیلو دالتون مشاهده می شود تایید کننده این ادعا می باشد.

شناخته شده هستند در هنگام استفاده از ماهی کامل طی فرآیند تغییر pH می توانند بعنوان عوامل بازدارنده در شکل گیری یک شبه ژل پیوسته با درصد بالای اکتومیوزین و واکنش مناسب میان آنها عمل نموده باشند. میزان فعالیت آنزیمی بالا در هنگام استفاده از ضایعات ماهی قزل آلا (Tazakaya et al., 2009)، ماهی تخلیه شکمی شده فیتوفاگ (Chen et al., 2009) و کریل (Chen and Jaczynski, 2007) طی فرآیند تغییر pH مانع از تشکیل شبکه پیوسته اکتومیوزین و نهایتاً ژل حرارتی گردید. این محققان در تمامی این موارد با استفاده از مهار کننده پروتئازی به ساختار ژلی قابل قبول رسیدند. از سوی دیگر خواص بافتی ضعیف تر در نمونه های حاصل از فرآیند اسیدی می تواند به دلیل دنا توره شدن شدید پروتئین و تخریب اکتومیوزین طی تجربه

جدول ۲ خصوصیات بافتی ژل تولیدی از مینس، سوریمی و پروتئین ایزوله آزمون تجزیه تحلیل پروفیل بافت

قابلیت جویدن (Chewiness)	صمغی بودن (Gumminess)	چسبندگی (N/s)	بهم پیوستگی	
۱/۲۰ ± ۰/۱۰ <sup>ab</sup>	۱/۴۰ ± ۰/۰۸ <sup>ab</sup>	۰/۱۳ ± ۰/۱۹ <sup>a</sup>	۰/۳۴ ± ۰/۰۲ <sup>b</sup>	مینس
۱/۸۸ ± ۰/۶۶ <sup>a</sup>	۲/۳۰ ± ۰/۸۰ <sup>a</sup>	۰/۱۷ ± ۰/۱۴ <sup>a</sup>	۰/۴۶ ± ۰/۰۹ <sup>a</sup>	سوریمی
۰/۷۵ ± ۰/۰۸ <sup>c</sup>	۰/۹۹ ± ۰/۰۵ <sup>c</sup>	۰/۱۵ ± ۰/۱۲ <sup>a</sup>	۰/۳۹ ± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	ایزوله قلیایی ماهی کامل
۰/۴۱ ± ۰/۰۶ <sup>d</sup>	۰/۶۴ ± ۰/۰۳ <sup>d</sup>	۰/۱۳ ± ۰/۰۹ <sup>a</sup>	۰/۳۴ ± ۰/۰۳ <sup>b</sup>	ایزوله اسیدی ماهی کامل
۱/۳۴ ± ۰/۱۱ <sup>ab</sup>	۱/۵۲ ± ۰/۱۲ <sup>ab</sup>	۰/۱۹ ± ۰/۱۵ <sup>a</sup>	۰/۴۳ ± ۰/۰۴ <sup>a</sup>	ایزوله قلیایی-تخلیه شکمی
۰/۶۷ ± ۰/۰۵ <sup>c</sup>	۰/۸۴ ± ۰/۰۹ <sup>c</sup>	۰/۱۴ ± ۰/۱۱ <sup>a</sup>	۰/۴۰ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup>	ایزوله اسیدی-تخلیه شکمی

\* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار ( $p < 0.05$ ) می باشد.

## رنگ ژل

ماهی کیلکا در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود بالاترین میزان سفیدی در ژل تولیدی از سوریمی حاصل از شستشو و پس از آن در مینس مشاهده شد. این امر بدلیل تهیه این محصولات از عضله روشن ماهی کیلکا می باشد که دارای مقادیر بسیار اندکی خون و رنگدانه های هموگلوبین و میوگلوبین می باشد.

رنگ و بخصوص سفیدی ژل یکی از شاخص های مهم در فرآورده های شیلاتی بازسازی شده می باشد و در اغلب کشورها محصولات با رنگ سفید تر از بازار پسنندی بالاتری برخوردار هستند. نتایج شاخص های رنگ و نیز سفیدی ژل تولیدی از مینس، سوریمی و پروتئین ایزوله

شکمی شده که سرشار از خون و رنگدانه ها هم می باشد، نمونه های ایزوله به مراتب رنگ تیره تری از خود نشان دادند. از سوی دیگر (Chaijan et al., 2007) نشان دادند که شرایط اسیدی و قلیایی اتواکسیداسیون رنگدانه های هم را قویا تشدید می کند.

(Yongsawatdigul and Park, 2004) نیز بالاترین میزان سفیدی را در نمونه های سوریمی تولیدی به روش متداول در سخره ماهی، سپس ایزوله قلیایی و نهایتا مینس عضله گزارش نمودند و نیز نتایج مشابهی پیرامون عضله ماهی طلال (Chanarat and Benjakul, 2013) گزارش گردید. اما در تحقیق حاضر بدلیل استفاده از ماهی کامل و تخلیه

جدول ۳ شاخص های رنگ ژل تولیدی از مینس، سوریمی و پروتئین ایزوله ماهی کیلکا

سفیدی	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>L</i>	
$61/42 \pm 1/41$ <sup>b</sup>	$21/50 \pm 0/57$ <sup>b</sup>	$-0/25 \pm 0/95$ <sup>c</sup>	$68/03 \pm 1/82$ <sup>b</sup>	مینس
$65/61 \pm 1/12$ <sup>a</sup>	$19/80 \pm 1/30$ <sup>b</sup>	$-1/60 \pm 0/67$ <sup>b</sup>	$72/50 \pm 1/00$ <sup>a</sup>	سوریمی
$32/56 \pm 0/87$ <sup>e</sup>	$22/40 \pm 2/40$ <sup>ab</sup>	$3/40 \pm 3/13$ <sup>a</sup>	$36/60 \pm 0/89$ <sup>d</sup>	ایزوله قلیایی ماهی کامل
$30/67 \pm 0/81$ <sup>e</sup>	$25/20 \pm 1/30$ <sup>a</sup>	$4/34 \pm 1/83$ <sup>a</sup>	$35/60 \pm 0/39$ <sup>d</sup>	ایزوله اسیدی ماهی کامل
$43/35 \pm 1/82$ <sup>c</sup>	$22/20 \pm 1/48$ <sup>ab</sup>	$-0/80 \pm 0/83$ <sup>b</sup>	$46/20 \pm 0/83$ <sup>c</sup>	ایزوله قلیایی-تخلیه شکمی
$40/07 \pm 1/14$ <sup>d</sup>	$24/20 \pm 1/48$ <sup>a</sup>	$-0/85 \pm 0/46$ <sup>b</sup>	$45/20 \pm 0/51$ <sup>c</sup>	ایزوله اسیدی-تخلیه شکمی

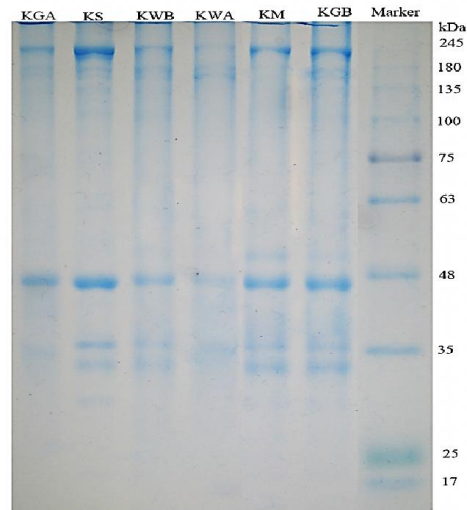
\* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار ( $p < 0/05$ ) می باشد.

(Yongsawatdigul and Park, 2004)، گربه ماهی کانالای (Kristinsson et al., 2005) و سرخو (Kristinsson and Liang, 2006) گزارش شده است.

#### الگوی توزیع وزن مولکولی پروتئین ها

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود، بیشترین شدت باند و تراکم حضور میوزین (وزن مولکولی ۲۰۵ کیلودالتون) و اکتین (۴۵-۴۳ کیلودالتون) در نمونه های ژل حاصل از شستشو و سپس ایزوله قلیایی کیلکای تخلیه شکمی شده وجود داشت.

نمونه های ایزوله بدست آمده از ماهی تخلیه شکمی شده نسبت به ایزوله ماهی کامل سفیدتر بودند و نیز ایزوله قلیایی در هر دو منبع رنگ سفید تری داشتند. رنگ سفید تر در ایزوله قلیایی ممکن است به دلیل حذف بالاتر پروتئین های هم که در شاخص رنگدانه کل نیز نشان داده شد (جدول ۱) و نیز اتواکسیداسیون کمتر رنگدانه های هم تحت تاثیر روش قلیایی باشد (Nolse and Undeland, 2009). بطور مشابهی رنگ سفید تری در ژل تولیدی از ایزوله قلیایی نسبت به ایزوله اسیدی در مورد ماهی هرینگ (Undeland et al., 2002)، سخره ماهی



**شکل ۳** توزیع وزن مولکولی ژل حاصل از مینس، سوریمی و پروتئین ایزوله. حروف به ترتیب از سمت چپ KGA: ایزوله ماهی تخلیه شکمی شده اسیدی؛ KS: سوریمی؛ KWB: ایزوله قلیایی ماهی کامل؛ KWA: ایزوله اسیدی ماهی کامل؛ KM: مینس؛ KGB: ایزوله قلیایی ماهی تخلیه شکمی شده و Marker نشان دهنده مارکر (۱۰-۲۴۵ کیلو دالتون) می باشد.

(2005) Jinx-Soo در مورد ماهی ماکرل و سرخو و نیز (2009) Rawdkuen et al. در مورد فیله ماهی تیلایا نشان دادند که مطابق الگوی ژل الکتروفورز تخریب زنجیره سنگین میوزین در حالت اسیدی به مراتب بیشتر از حالت قلیایی می باشد. این تخریب بیشتر زنجیره سنگین در مقادیر بالاتر پپتیدهای محلول در TCA نیز مشاهده شد.

#### نتیجه گیری کلی

روش تغییر pH جهت بازیافت پروتئین از ماهی کیلکا در حالت کامل و تخلیه شکمی شده و نیز با استفاده از هر دو روش اسیدی و قلیایی انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که پروتئین ایزوله بازیافتی از کیلکای تخلیه شکمی در حالت قلیایی بدلیل حذف بهتر رنگدانه و تخریب کمتر زنجیره سنگین میوزینی دارای خواص بافتی و ظرفیت نگهداری آب بهتری نسبت به ایزوله حاصل از کیلکای کامل و یا ایزوله حاصل از روش اسیدی می باشد. با این وجود

در تمامی نمونه ها مطابق شدت باند بالای مشاهده شده در ۴۳-۴۵ کیلودالتون اکتین فراوان ترین پروتئین میوفیبریلی در ساختار ژل به نظر می آید. غلظت بالاتر میوزین در ژل سوریمی نسبت به مینس نشان دهنده کارایی فرآیند شستشو در تراکم اکتومیوزین و حذف پروتئین ها سارکوپلاسمیک و رنگدانه بدون اثر تخریبی بر میوزین یا شستشوی زیاد آنها می باشد. همچنین دیگر ژل های تولیدی از کیلکای تخلیه شکمی شده درصد بالاتری از میوزین و اکتین را نسبت به ژل های تولیدی از کیلکای کامل نشان دادند که این امر می تواند موید وجود درصد کمتر این پروتئین های میوفیبریلی در ساختار ایزوله حاصل و نیز تخریب آنها در اثر فعالیت شدید آنزیم های پروتئازی طی فرآیند پخت ژل باشد.

از سوی دیگر ژل های حاصل ایزوله تولیدی به روش قلیایی مقدار نسبی میوزین و اکتین بالاتر از نمونه های اسیدی بود که با نتایج مشاهده شده در خواص بافتی و ظرفیت نگهداری آب نیز هم خوانی دارد. Yeung and

**Chaijan, M., & Undeland, I. 2015.** Development of a new method for determination of total haem protein in fish muscle, *Food Chemistry*, 173, 1133–1141.

**Chen Y.-C., 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.

**Chen Y.-C., Tou J. C., Jaczynski J. 2009.** Amino acid and mineral composition of protein and other components and their recovery yields from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) using isoelectric solubilization/precipitation, *Journal of Food Science*, 74(2): 31-39.

**FAO. 2012.** *World Fisheries and Aquaculture*.

**Gehring, C. K., Gigliotti, J. C., Moritz, J. S., Tou, J. C., Jaczynski, J. 2011.** Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish: a review. *Food Chemistry*, 124(2), 422–431.

**Hornsey, H. C. 1956.** The color of cooked cured pork. I. Estimation of nitric oxidehaem pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7, 534–540

**Hultin H. O., Kristinsson H. G., Lanier, T. C., Park, J.W. 2005.** Process for recovery of functional proteins by pHshifts. In: *Surimi and Surimi Seafood*. Park, J.W. (Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor&Francis Group, LLC. Pp.107–140.

**Iranian Fisheries Orgnization. 2011.** Annual Fisheries Statistics. pp. 32. In Farsi.

**Kelleher S.D., Feng Y., Hultin H.O., Livingston M.B. 2004.** Role of initial muscle pH on the solubility of fish muscle proteins in water, *Journal of Food Biochemistry*, 28(4): 279-292.

**Kristinsson, H., Liang, Y. 2006.** Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) muscle proteins. *Journal of Food Science*, 71(5), 304-312.

**Kristinsson H.G., Theodore A.E., Demir N., Ingadottir B. A., 2005.** comparative study between acid- and alkali-aided processing and Surimi processing for the recovery of proteins from channel

خواص مذکور در ایزوله قلیایی ماهی تخلیه شکمی شده از سوریمی حاصل از عضله ضعیف تر بود. همچنین رنگ نمونه های تولیدی از ایزوله ماهی تخلیه شکمی شده از سفیدی بسیار پایین تری نسبت به سوریمی عضله این گونه برخوردار بود که لزوم مطالعات بیشتر جهت حذف عوامل ایجاد رنگ قرمز (رنگدانه های هموپروتئینی) و یا استفاده از سایر روش های بهبود رنگ را قویا نشان می دهد.

#### منابع

**Batista I., Pires C., Nelhas R., Godinho V. 2006.** Acid and alkaline-aided protein recovery from Cape Hake by-products. In J. B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Sæbø, & J. Oehlenschläger (Eds.), *Seafood research from fish to dish* (pp. 427–437). Wageningen: Wageningen Academic Serial (Book, Monograph).

**Cardoso, C., Mendes, R., Vaz-Pires, P., & Nunes, M. L. 2010.** Effect of salt and MTGase on the production of high quality gels from farmed sea bass. *Journal of Food Engineering*, 101(1), 98–105.

**Chaijan M., Panpipat W., Benjakul S., 2010.** Physicochemical and gelling properties of short-bodied mackerel (*Rastrelliger brachysoma*) protein isolate prepared using alkaline-aided process, *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3): 174-180.

**Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Faustman, C. 2005.** Physicochemical properties, gel-forming ability and myoglobin content of sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi produced by conventional method and alkaline solubilisation process. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 58–63.

**Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Faustman, C. 2007.** Characterisation of myoglobin from sardine (*Sardinella gibbosa*) dark muscle. *Food Chemistry*, 100: 156–164.

**Chanarat S., Benjakul S. 2013.** Impact of microbial transglutaminase on gelling properties of Indian mackerel fish protein isolates, *Food Chemistry*, 136(2): 929-37.

- Fisheries Training Programme. Final project report. P 34.
- Tahergorabi, R., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2015). Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*. Article In press.
- Taskaya L., Chen Y.-C., 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.
- Torres J. A., Chen Y., Rodrigo-García J., Jaczynski J. 2007.** Recovery of by-products from seafood processing streams. In Maximising the value of marine by-products. Ed. Shahidi, F. (65-90). WoodheadPublishingLimitedandCRCPressLLC. 559 p.
- Undeland I., Kelleher S.D., 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.
- Yeung CJ, Kim J-S. 2005.** Fish protein recovered using pH shifting method and its physicochemical properties, *Journal of Ocean University of China*, 4(3): 224-8.
- Yeung, C. J., Jinx-Soo, K. 2005.** Fish protein recovered using pH shifting method and its physicochemical properties. *Journal of Ocean University of China*, 4, 224–228.
- Yongsawatdigul, J., Park, J. W. 2004.** Effects of Alkali and Acid Solubilization on Gelation Characteristics of Rockfish Muscle Proteins. *Journal of Food Science*, 69(7), 499–505.
- cattfish muscle, *Journal of Food Science*, 70(4): 298-306.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227, 680–685.
- Markwell, M. A. K.; Haas, S. M.; Bieber, L. L.; Tolbert, N. E. A. 1978.** Modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87 (1), 206–210.
- Marmon S. 2012.** Protein isolation from herring (*Clupea harengus*) using the pH-shift process. PhD Thesis, Göteborg, Sweden. 80 p.
- Marmon, S. K., Krona, A., Langton, M., Undeland, I. 2012.** Changes in salt solubility and microstructure of proteins from herring (*Clupea harengus*) after pH-shift processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7965–7972.
- Marmon, S. K., Undeland, I. 2010.** Protein isolation from gutted herring (*Clupea harengus*) using pH-shift processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10480–6.
- Mohan, C. O., Ravishankar, C. N., Lalitha, K. V., Srinivasa Gopal, T. K. 2012.** Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 167–174.
- Nolsøe, H., & Undeland, I. 2009.** The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. *Food and Bioprocess Technology*, 2(1), 1–27.
- Panpipat W., Chaijan M., Benjakul S. 2010.** Gel properties of croaker–mackerel surimi blend, *Food Chemistry*, 122(4): 1122–1128.
- Perez-Mateos M., Lanier T.C. 2006.** Comparison of Atlantic menhaden gels from surimi processed by acid or alkaline solubilization, *Food Chemistry*. 101(3): 1223-9.
- Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., Khamsorn, S., Chaijan, M., Benjakul, S. 2009.** Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. *Food Chemistry*, 112(1), 112–119.
- Shaviklo G.R. 2006.** Quality assessment of fish protein isolates using surimi standard methods-



## Gel forming and physico-chemical properties of protein recovered from whole and gutted common kilka (*Clupeonella cultriventris*)

Mehdi Abdollahi<sup>1</sup>, Masoud Rezaei<sup>2\*</sup>, Seyed Ali Jafarpour<sup>3</sup>

1-Ph.D. Student, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor

2-Professor, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor

3-Associate professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari University of Agriculture and Natural Recourse, Sari

Received: 02.07.2015 Accepted: 23.11.2015

\*Corresponding author: rezai\_ma@modares.ac.ir

### Abstract:

The present study was conducted to evaluate the efficacy of the pH-shift process in protein recovery from whole and gutted common kilka and characteristics of the produced gel compared with muscle surimi obtained with the conventional method. Although both acidic and alkaline methods reduced total pigment (TP) in isolates obtained from the whole and gutted fish, the alkaline version was more effective and the lowest amount of TP was observed in the isolate from gutted fish using alkaline version. The last sample also contained the lowest amount of TCA soluble peptide which was significantly lower than the others. Also, gel produced from the isolate recovered from gutted kilka with the alkaline version had significantly higher water holding capacity and gel hardness but it was weaker than the sample obtained with conventional method. The results were supported with higher relative amount of actomyosin and actin in the structure of the gels produced from the gutted fish isolate and surimi from fish muscle, as reflected in SDS-PAGE. Nevertheless, the whiteness of the samples recovered with pH-shift process was quite lower than the muscle surimi which reveals the necessity of more research in this area.

**Keywords:** Kilka fish, Fish protein isolate, pH-shift process, Value added seafood products, Surimi