



بهینه‌یابی پروتئین آبکافت‌شده سر و بازوی ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) با استفاده از آنزیم آلکالاز

کیوان علی عسگری^۱، سکینه یگانه*^۲، سید علی جعفر پور^۳، رضا صفری^۴

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
- ۲- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
- ۳- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
- ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ایران

دریافت: ۹۴/۰۸/۱۹ پذیرش: ۹۵/۱۱/۰۹

*نویسنده مسئول مقاله: skyeganeh@gmail.com

چکیده:

در این پژوهش، بهینه‌یابی پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) بررسی شد. برای این منظور، اثر شرایط مختلف بر تولید پروتئین آبکافت‌شده سر و بازوی ماهی مرکب ببری با استفاده از آنزیم آلکالاز با روش پاسخ سطحی (RSM) مدنظر قرار گرفت. طرح باکس-بنکن با سه عامل و ۳ سطح، به‌منظور بهینه‌یابی روند آبکافت و بررسی اثر فردی و متقابل عوامل آزمایش استفاده گردید. عوامل این آزمایش شامل نسبت آنزیم به سوبسترا (درصد)، دما (°C) و pH بود. درجه آبکافت به‌عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. مدل ریاضی، برازش خوبی با داده‌های آزمایش داشت. براساس نتایج به‌دست آمده، شرایط بهینه از لحاظ دما، pH و نسبت آنزیم به سوبسترا به‌ترتیب عبارت بودند از ۵۴/۳۳ درجه سانتی‌گراد، ۸/۴۹ و ۱/۹۷ درصد که منجر به درجه آبکافت معادل ۱۴/۵ درصد گردید. عامل نبود برازش در این مطالعه معنادار نبود که نشان‌دهنده قابلیت الگو در پیش‌بینی دامنه‌های استفاده شده در این آزمایش بود. برای تأیید شرایط بهینه پیش‌بینی شده، پروتئین آبکافت‌شده با شرایط پیشنهاد شده الگو تولید گردید که درجه آبکافت آن ۱۶/۸ درصد به‌دست آمد، که مطابق با هدف این تحقیق یعنی تولید پروتئین آبکافت‌شده با حداکثر درجه آبکافت بود. سپس خواص کارکردی پروتئین حاصل از شرایط بهینه اندازه‌گیری شد. بررسی خواص کارکردی نشان داد که این پودر پروتئینی از نظر حلالیت مناسب، ولی از نظر ظرفیت امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی ضعیف است.

کلید واژگان: بهینه‌یابی، پروتئین آبکافت‌شده، آلکالاز، ماهی مرکب، خواص کارکردی

مقدمه

(Oveissipour et al., 2010) و یا استفاده از آن برای تهیه محیط کشت میکروبی (با توجه به محتوای نیترژنی) است (Safari et al., 2012).

پروتئین آبکافتی مجموعه‌ای از پپتیدها هستند که در اثر شکسته شدن زنجیره‌های پروتئینی به وجود می‌آیند. از روش‌های مختلفی همچون تخمیر میکروبی، آبکافت شیمیایی و آنزیمی برای شکستن زنجیره‌های پروتئین به منظور تولید پروتئین آبکافتی استفاده می‌شود. در بین روش‌های مختلف، آبکافت آنزیمی به عنوان مؤثرترین روش برای تولید پروتئین آبکافتی شناخته می‌شود (Kristinsson and Rasco, 2000). آبکافت آنزیمی پروتئین، موجب بهبود خواص کارکردی شامل حلالیت، امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی می‌شود. خواص کارکردی پروتئین آبکافتی وابسته به پپتیدها و آمینواسیدهای تولیدشده در فرایند هیدرولیز است که دارای وزن مولکولی کم و تعداد گروه‌های یونی بیشتر می‌باشد (Souissi et al., 2007). آنزیم‌های مختلفی شامل پاپائین، آلکالاز، نئوتراز، فلاورزایم، پروتامکس و ... برای آبکافت استفاده می‌شوند (Aspmo et al., 2005). اصلاح آنزیمی پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز به ویژه آلکالاز که باعث شکسته شدن پروتئین‌ها از نقاط خاص می‌شوند، به صورت گسترده در صنایع غذایی کاربرد دارد (Mullally et al., 1994).

با توجه به این‌که ویژگی‌های پروتئین آبکافت شده بسته به نوع سویسترا، نوع و میزان آنزیم و شرایط آبکافت متفاوت است (Kristinsson and Rasco, 2000)، بهینه‌یابی شرایط تولید پروتئین آبکافت شده می‌تواند باعث صرفه‌جویی در هزینه و میزان آنزیم مورد استفاده گردد. روش‌های آماری از قبیل سطح پاسخ برای بهینه‌یابی، در فرایندهای آنزیمی به کار گرفته می‌شود (Haltrich et al., 1994)، از این‌رو در این تحقیق، بهینه‌یابی پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب

افزایش روزافزون آگاهی نسبت به ارزش تغذیه‌ای، سلامت و بهداشت مواد غذایی، سبب افزایش تقاضا برای مواد خوراکی مغذی و سالم شده است. در این رابطه آبزیان خوراکی به عنوان منابع غنی از پروتئین با قابلیت هضم آسان و ارزش بیولوژیکی بالا از جایگاه خاصی برخوردارند (Razavi-Shirazi, 2001).

ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) گونه غالب رده سرپایان در آب‌های جنوب کشور است (Valinasab, 1992). براساس آمار FAO میزان صید آن در ایران ۵۱۰۲ تن در سال است (FAO, 2013) که به صورت مستقیم یا ضمنی همراه با صید میگو به دست می‌آید و بیشتر آن برای صادرات به کارخانجات عمل‌آوری منتقل و پس از حذف ضایعات، مانند آن بسته‌بندی و به خارج از کشور صادر می‌شود. فراوری انواع آبزیان که این آبرزی نیز از آن مستثنا نیست، همواره دارای ضایعات است. ضایعات تولیدی یا دور ریخته شده و باعث افزایش آلودگی و مشکلات زیست‌محیطی می‌شوند (Ktari et al., 2013) و یا به صورت پودر، در جیره غذایی دام و طیور به کار می‌روند.

تقاضای بالا برای پروتئین در سطح جهانی توجه بشر را به منابع پروتئین کم‌مصرف معطوف کرده است (Kristinsson and Rasco, 2000)، ضایعات ناشی از مصرف آبزیان، منبع غنی از ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین است (Bhaskar et al., 2008)، بنابراین یکی از گزینه‌ها برای استفاده از این ضایعات حاوی پروتئین، تولید پودر پروتئین آبکافت شده (Hamzeh et al., 2016) برای مصرف انسانی در سیستم غذایی (به عنوان پایدارکننده، طعم‌دهنده، آنتی‌اکسیدان و پپتیدهای زیست‌فعال) (Nalinanon et al., 2011; Harnedy and FitzGerald, 2012)، مصرف دامی و طیور (به عنوان مکمل پروتئینی با قابلیت هضم‌پذیری بالا)

بری (*Sepia pharaonis*) با استفاده از آنزیم آلکالاز با روش سطح پاسخ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

ماهی مرکب از بازار ماهی‌فروش‌ها در شهرستان کنگان استان بوشهر خریداری، سپس شستشو داده شد و در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید و در کنار یخ به شهر ساری منتقل شد و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آنزیم استفاده شده، آنزیم میکروبی آلکالاز (۲/۴ L, E.C. 3.4) بود که از شرکت Novozymes (دانمارک) خریداری و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ترکیب شیمیایی

رطوبت و خاکستر نمونه‌ها به روش استاندارد (AOAC, 2005)، محتوای لیپید در نمونه‌ها با دستگاه سوکسله و پروتئین تام ($N \times 6.25$) با استفاده از روش کجلدال تعیین شد (AOAC, 2005). پروتئین محلول در مایع روماندا^۱ به وسیله روش Biuret به دست آمد (Layne, 1957).

تهیه پروتئین آبکافت‌شده

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا ماهی مرکب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، انجمادزدایی سپس سر و بازو جدا گردید و با چرخ‌گوشت، چرخ شد و با آب مقطر (نسبت ۲:۱ v/w) مخلوط و با همزن به مدت ۲ دقیقه همگن شد. سپس به منظور غیرفعال کردن آنزیم‌های درونی در حمام آب گرم در دمای ۸۰°C به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد (Ovissipour et al., 2012). نمونه‌ها براساس روش سطح پاسخ (RSM)، طرح باکس-بنکن، در ۱۵ گروه در ۱۲۰ دقیقه (Wasswa et al., 2007) و با شرایط آبکافتی نسبت آنزیم به سوبسترا (۱، ۱/۵ و ۲ درصد)، pH (۷/۵، ۸ و ۸/۵) و تنظیم pH با استفاده

از محلول هیدروکسید سدیم ۱ نرمال) و دما (۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد) تعریف و تیمار بندی شد (جداول ۱ و ۳)؛ سپس در بن‌ماری شیکردار در معرض آنزیم قرار گرفتند. در نهایت به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم آلکالاز، نمونه‌ها در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. به منظور جداسازی مواد نامحلول از پروتئین‌های محلول، در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور $8000 \times g$ برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از به دست آوردن شرایط بهینه پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب به وسیله مدل، پروتئین آبکافتی تحت شرایط بهینه تولید گردید و به روش انجماد خشک، پودر گردید و برای بررسی خواص کارکردی از این پودر استفاده شد.

تعیین درجه آبکافت

درجه آبکافت براساس روش Hoyle و Merritt (1994) به دست آمد. پس از آبکافت، فاز محلول حاوی پروتئین آبکافت جدا و محلول تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۲۰ درصد به نسبت ۱:۱ به آن اضافه گردید. نمونه به مدت ۱۰ دقیقه (۶۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد) سانتریفوژ شد و محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد شفاف حاوی پروتئین‌های محلول جمع‌آوری شد. سپس درجه آبکافت براساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (N_2) \text{ کل در نمونه} / N_2 \text{ موجود در محلول} \times 10 \%$$

$$DH \% = (\text{TCA در نمونه})$$

نیترژن کل با استفاده از روش Biuret به دست آمد (Layne, 1957).

جدول ۱ متغیرهای مستقل و سطوح استفاده شده در بهینه‌یابی آبکافت آنزیمی سر و بازوی ماهی مرکب با استفاد از RSM

سطوح و حدود متغیرها			علامت	متغیرهای مستقل
-۱	۰	+۱		
۱	۱/۵	۲	X _۱	نسبت آنزیم به سویسترا (v/w درصد)
۴۵	۵۰	۵۵	X _۲	دما (درجه سانتی‌گراد)
۷/۵	۸	۸/۵	X _۳	pH

رنگ پودر پروتئینی

رنگ‌سنجی با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج (IMG-Pardazesh CAM-system XI, شرکت ابزارکاران فن پویای شمال-ایران) انجام شد. پس از عکس‌برداری اولیه مقادیر L*، b* و a* که به ترتیب شامل روشنایی (L)، قرمزی (a) و زردی (b) هستند و همچنین سفیدی W با دستگاه مجهز به رایانه تعیین و رنگ پودر پروتئینی ماهی مرکب ارزیابی شد.

حلالیت

حلالیت مطابق روش Al-Khateeb و Synowiecki (2000) انجام شد. طبق این روش محلول ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. pH محلول با کمک اسیدکلریدریک و هیدروکسیدسدیم ۰/۱ نرمال در ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ تنظیم شد و نمونه‌ها با دور بالا به مدت یک دقیقه هم زده شدند. سپس نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه استراحت به مدت ۱۵ دقیقه با شدت ۱۲۰۰۰×g سانتریفوژ شدند و غلظت پروتئین مایع رومانند نمونه به روش Biuret اندازه‌گیری شد. درصد حلالیت مطابق رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد حلالیت} = \frac{\text{مقدار پروتئین در مایع رومانند}}{\text{مقدار پروتئین نمونه}} \times 100$$

ظرفیت امولسیون‌کنندگی

ظرفیت امولسیون‌کنندگی براساس روش Šližytė و همکاران (2009) انجام شد. مطابق این روش ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از پروتئین تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استراحت داده شد. ۱۰ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان خالص به آن افزوده شد و مخلوط با اولتراتراکس (IKA, Germany T25) با سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۹۰ ثانیه هم زده شد. سپس ۳ دقیقه با دور

۲۴۰۰×g سانتریفوژ شد. حجم بخش امولسیون‌شده قرائت گردید. میزان ظرفیت امولسیون‌کنندگی به صورت حجم قسمت امولسیون‌شده به حجم کل بیان گردید.

ظرفیت کف‌کنندگی

ظرفیت کف‌کنندگی براساس روش Onodenalore و Shahidi (1996) انجام شد که طبق آن ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد پروتئینی تهیه و در استوانه مدرج ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس به مدت یک دقیقه با اولتراتراکس با سرعت

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij} X_i X_j$$

Y عبارت است از متغیر وابسته (درجه آبکافت)، β_0 و β_i و β_{ii} و β_{ij} ثابت‌های برآوردشده به‌وسیله مدل هستند. X_i و X_j سطح متغیرهای مستقل بوده و آنها به‌ترتیب نمایانگر اثرهای خطی، درجه دوم و اثرهای متقابل متغیرهای X_1 ، X_2 و X_3 روی پاسخ می‌باشند. این مدل اثر هر متغیر را روی پاسخ نشان می‌دهد.

نتایج

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی ماده خام و پودر پروتئین آبکافت‌شده به‌وسیله آنزیم آلکالاز در جدول ۲ ارائه شده است. این نتایج نشان داد که پس از آبکافت میزان پروتئین و خاکستر افزایش یافته و میزان چربی و رطوبت کاهش یافت.

جدول ۲ ترکیب شیمیایی ماده خام و پودر پروتئین آبکافت‌شده

ماده	درصد پروتئین	درصد چربی	درصد رطوبت	درصد خاکستر
ماده خام	۱۷/۴۸	۴/۱۶	۷۵/۵۹	۱/۳۵
پودر پروتئین آبکافت‌شده	۸۵/۲۶	۱/۲۶	۶/۲۵	۳/۵۸

که نشان‌دهنده دقت بالای مدل در تخمین متغیر پاسخ است. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) اثرهای عوامل مختلف شامل نسبت آنزیمی، دما و pH بر درجه آبکافت در جدول ۴ نشان داده شده است. مقدار احتمال یا P-Value مدل برای درجه آبکافت سر و بازوی ماهی مرکب ۰/۰۰۰۵ بود، از این‌رو نشان‌دهنده معناداری مدل می‌باشد.

۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد. حجم مخلوط نهایی قرائت شد. درصد افزایش حجم در زمان صفر نسبت به حجم محلول اولیه به‌عنوان ظرفیت کف‌کنندگی در نظر گرفته شد.

$$\text{درصد ظرفیت کف‌کنندگی} = [(A-B)/B] \times 100$$

A = حجم نمونه پس از تشکیل کف (میلی‌لیتر)

B = حجم نمونه پیش از تشکیل کف (میلی‌لیتر)

طرح آماری

بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین آبکافت‌شده، با استفاده از روش پاسخ سطحی (RSM) براساس مدل باکس-بنکن انجام گردید. طبق این مدل تعداد ۱۵ تیمار (جدول ۳) به‌وسیله نرم‌افزار Design Expert 7.0.0 پیشنهاد شد که در نقطه مرکزی آزمایش ۳ بار تکرار شدند. سه متغیر مستقل نسبت آنزیم به سویسترا (X_1)، دما (X_2) و pH (X_3) در سه سطح (+۱، ۰، -۱) ارزیابی شدند. درجه آبکافت به‌عنوان پاسخ به متغیرها در نظر گرفته شد. پاسخ سیستم آزمایشی براساس معادله زیر انجام گرفت:

درجه آبکافت

نتایج مربوط به درجه آبکافت به‌عنوان متغیر وابسته در تیمارهای تعریف شده در جدول ۳ نشان داده شده است. بیشترین درجه آبکافت مربوط به تیمار ۱۴ (۱۳/۷۷۲ درصد) و کمترین درجه آن مربوط به تیمار ۱۰ (۳/۳۹ درصد) بود. همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین مقادیر درجه آبکافت واقعی و تخمینی تفاوت کمی وجود دارد

جدول ۳ طرح آزمایش های درجه آبکافت سر و بازوی ماهی مرکب و مقدار درجه آبکافت واقعی و پیش بینی شده در طرح باکس-بنکن

تیمار	X ₁	X ₂	X ₃	DH (%)	
	۱-۲ (/)	۴۵-۵۵ (°C)	۷/۵-۸/۵	آزمایش	تخمین
۱	۰	۰	۰	۸/۱۳	۸/۷۱
۲	۰	+۱	+۱	۱۰/۹۸۴	۱۰/۷۷
۳	+۱	+۱	۰	۱۱/۸۶۵	۱۲/۰۲
۴	-۱	۰	+۱	۷/۶۲۷	۷/۳۸
۵	۰	۰	۰	۸/۸۸۹	۸/۷۱
۶	۰	-۱	+۱	۶/۷۸	۷/۱۸
۷	-۱	۰	-۱	۵/۲۰۴	۵/۱۴
۸	+۱	۰	-۱	۷/۴۱۵	۷/۶۷
۹	-۱	+۱	۰	۶/۲۹۷	۶/۷۶
۱۰	۰	-۱	-۱	۳/۳۹۰	۳/۶۰
۱۱	۰	۰	۰	۹/۱۱۰	۸/۷۱
۱۲	-۱	-۱	۰	۴/۷۲۰	۴/۵۷
۱۳	+۱	-۱	۰	۸/۷۴۶	۸/۲۸
۱۴	+۱	۰	+۱	۱۳/۷۷۲	۱۳/۸۳
۱۵	۰	+۱	-۱	۶/۳۵۶	۵/۹۵

چندجمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معناداری ضرایب، مدل پیشنهادی زیر ارائه گردید:

$$DH = 8.71 + 2.24(X^1) + 1.48(X^2) + 2.10(X^3) + 0.98(X^1 X^2) - 1.22(X^2 X^3)$$

آزمون ANOVA مشخص کرد که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ است. به عبارتی $R^2 = 0.9854$ بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده است. مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون نبود برازش^۱ بررسی شد که معنادار نبود. بنابراین این مدل برای پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. تجزیه تحلیل‌های آماری نشان می‌دهد در مدل آزمایش، هر سه عامل به صورت مستقل، تأثیر بسیار معناداری بر درجه آبکافت دارند ($p < 0.01$) و اثر متقابل آنها فقط در مورد نسبت آنزیم به سوبسترا و pH، معنادار است و همچنین اثر درجه دوم فقط در خصوص دما بسیار معنادار است. براساس این نتایج، ضرایب رگرسیونی چندگانه به منظور پیش‌بینی مدل

1. Lack of Fit

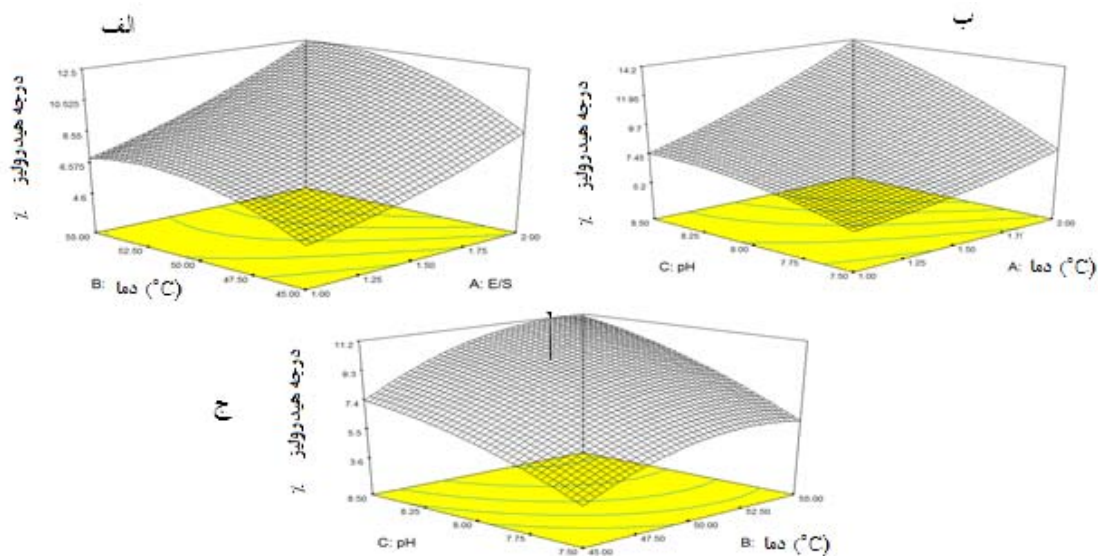
جدول ۴ تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از سطح پاسخ برای درجه آبکافت

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P Prob>F	معنادار
مدل	۱۰۵/۵۸	۹	۱۱/۷۳	۳۷/۵۷	۰/۰۰۰۵	معنادار
E/S-A	۴۰/۲۸	۱	۴۰/۲۸	۱۲۸/۹۸	<۰/۰۰۰۱	
B-دما	۱۷/۶۰	۱	۱۷/۶۰	۵۶/۳۶	۰/۰۰۰۷	
pH-C	۳۵/۲۷	۱	۳۵/۲۷	۱۱۲/۹۵	۰/۰۰۰۱	
AB	۰/۵۹	۱	۰/۵۹	۱/۹۰	۰/۲۲۶۲	
AC	۳/۸۷	۱	۳/۸۷	۱۲/۳۹	۰/۰۱۶۹	
BC	۰/۳۸	۱	۰/۳۸	۱/۲۳	۰/۳۱۸۴	
A ²	۰/۶۲	۱	۰/۶۲	۱/۹۹	۰/۲۱۷۲	
B ²	۵/۴۶	۱	۵/۴۶	۱۷/۵۰	۰/۰۰۸۶	
C ²	۱/۴۱	۱	۱/۴۱	۴/۵۳	۰/۰۸۶۶	
باقیمانده	۱/۵۶	۵	۰/۳۱			
نیود برازش	۱/۰۳	۳	۰/۳۴	۱/۲۹	۰/۴۶۴۸	غیرمعنادار
خطای خالص	۰/۵۳	۲	۰/۲۷			
کل	۱۰۷/۱۴	۱۴				

نسبت آنزیم به سوبسترا، درجه آبکافت روند صعودی به خود گرفته و کاهش را به نمایش گذاشته است. شکل ۱- ج بیانگر تغییرات درجه آبکافت در دماها و pHهای مورد آزمایش است که نشان می‌دهد افزایش دما منتج به افزایش درجه آبکافت می‌شود و سپس درجه آبکافت روند کاهشی به خود می‌گیرد. همچنین بالارفتن pH نیز باعث افزایش درجه آبکافت می‌شود، ولی با افزایش بیشتر آن، از میزان درجه آبکافت کاسته می‌شود.

به‌منظور تعیین شرایط بهینه هر متغیر در آبکافت آنزیمی، برای حصول بالاترین درجه آبکافت، نمودارهای سه بعدی و کانتر^۱ برای متغیرها در شکل‌های ۱- الف، ب و ج ترسیم شده است. هر شکل اثرهای دو متغیر را روی پاسخ نشان می‌دهد که در هر نمودار متغیر سوم در میزان بهینه‌اش ثابت نگه داشته شده است. همان‌طور که در شکل ۱-الف مشخص است با افزایش دمای آبکافت، درجه آبکافت در یک نسبت آنزیم به سوبسترای ثابت، افزایش یافته و در دماهای بالاتر دستخوش کاهش شده است. مطابق این شکل، بالارفتن نسبت آنزیم به سوبسترا در یک دمای ثابت باعث افزایش میزان درجه آبکافت می‌گردد. در شکل ۱-ب که تغییرات درجه آبکافت در نسبت‌های مختلف آنزیمی و pH را نشان می‌دهد، مشخص است که متغیر pH در ناحیه ۸/۴۹ بیشترین اثر را در افزایش درجه آبکافت داشته، همچنین با افزایش

1. Contour plot



شکل ۱ نمودارهای سه بعدی و کانتر تغییرات درجه آبکافت در شرایط مختلف آزمایشی؛ الف: تغییرات درجه آبکافت در نسبت‌های آنزیم به سوبسترا و دماهای مورد آزمایش، ب: تغییرات درجه آبکافت در نسبت‌های آنزیم به سوبسترا و pHهای مورد آزمایش، ج: تغییرات درجه آبکافت در دماها و pHهای مورد آزمایش

بهینه‌سازی مدل

شرایط بهینه با نرم‌افزار Design Expert 7.00 به دست آمد. هدف^۱ متغیرهای مستقل آزمایش‌های انجام شده، در «محدوده» و «اعتبار»^۲ آنها، ۳ تنظیم شد. هدف متغیر پاسخ یا همان درجه آبکافت نیز در «حداکثر» و «اعتبار» آن، ۵ تنظیم گردید. پس از تنظیم محدوده‌ها، آزمون‌ها با نرم‌افزار بررسی شدند و ۵ نمونه از بهترین شرایط بهینه برای ارزیابی بیشتر فهرست شد (جدول ۵). مطلوبیت^۳ نزدیک به ۱ بهترین شرایط را بیان می‌کند. شرایط بهینه آبکافت برای پروتئین آبکافت‌شده با درجه مطلوبیت ۱ بدین صورت بود: نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۹۷ درصد، دمای ۵۴/۳۳ درجه سانتی‌گراد و pH ۸/۴۹ (جدول ۵).

1. Goal
2. Importance
3. Desirability

جدول ۵ شرایط بهینه آبکافت و حداکثر میزان درجه آبکافت

شماره	E/S (%)	دما (°C)	pH	درجه آبکافت (%)	مطلوبیت
۱	۱/۸۸	۵۴/۸۵	۸/۴۸	۱۴/۰۲۹۱	۱/۰۰۰
۲	۱/۹۸	۵۴/۰۵	۸/۴۹	۱۴/۲۶۹۹	۱/۰۰۰
۳	۱/۹۷	۵۴/۳۳	۸/۴۹	۱۴/۵۰۰۲	پیشنهادی ۱/۰۰۰
۴	۱/۹۹	۵۴/۵۲	۸/۴۱	۱۴/۰۶۰۶	۱/۰۰۰
۵	۱/۹۸	۵۴/۹۶	۸/۴۰	۱۴/۱۶۰۱	۱/۰۰۰

از نظر درجه آبکافت است و برای بررسی های بعدی از این پروتئین استفاده شد.

رنگ پودر پروتئینی

شاخص های رنگ برای پودر پروتئین آبکافت شده ماهی مرکب در جدول ۶ آمده است. این شاخص ها نشان می دهند که پودر پروتئینی ماهی مرکب دارای روشنایی و سفیدی بالا و قرمزی و زردی کم است.

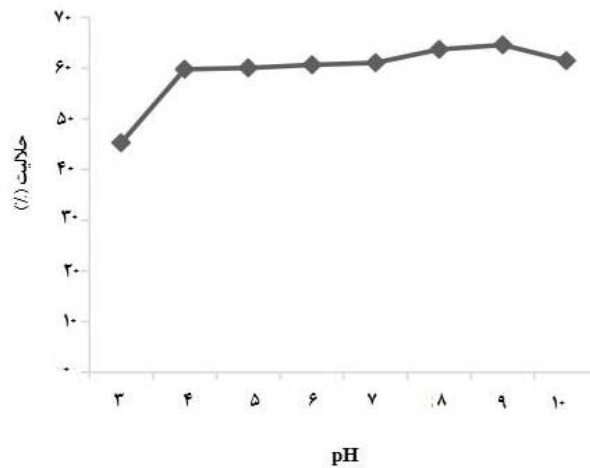
به منظور تأیید شرایط پیشنهاد شده، آزمایشی تحت شرایط پیش بینی شده به وسیله مدل، اجرا گردید (در سه تکرار) که در این شرایط پروتئین آبکافت شده با درجه آبکافت ۱۶/۸ درصد به دست آمد. این مقدار تقریباً مطابق با مقدار پیش بینی شده توسط مدل بود که بیانگر شرایط بهینه برای تولید پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ببری

جدول ۶ شاخص های رنگ برای پودر پروتئینی سر و بازوی ماهی مرکب

نمونه	L*	a*	b*	W
پودر پروتئینی	۸۸	-۱	۱/۸	۸۸۷۷

خواص کارکردی
حلالیت پروتئین آبکافتی در pHهای ۳ تا ۱۰ در شکل ۲ نشان داده شده است. کمترین حلالیت پروتئین آبکافتی در pH= ۳ و بیشترین آن (۶۴/۶ درصد) در pH= ۹ به دست آمد.

خواص کارکردی
حلالیت پروتئین آبکافتی در pHهای ۳ تا ۱۰ در شکل ۲ نشان داده شده است. کمترین حلالیت پروتئین آبکافتی در



شکل ۲ حلالیت پروتئین آبکافت شده در آب در pHهای مختلف

ظرفیت امولسیون‌کنندگی پودر پروتئینی برابر با ۵ درصد و ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین آبکافتی برابر با ۱۵ درصد بود.

بحث

طی استفاده از این اسید و باز، نمک تولید می‌گردد و افزایش میزان خاکستر را به دنبال دارد.

نتایج مربوط به بهینه‌سازی شرایط آبکافت نشان داد که با افزایش دما ابتدا درجه آبکافت افزایش و سپس کاهش یافته است. افزایش دما با سرعت بخشیدن به واکنش بین آنزیم و سویسترا باعث افزایش درجه آبکافت می‌گردد تا به دمای بهینه برسد. سپس با افزایش بیشتر، احتمالاً به علت دناتوره شدن آنزیم باعث تغییر ساختار دوم و سوم و تغییر در قسمت فعال پروتئین آنزیم می‌شود که سبب کاهش فعالیت بیولوژیک آنزیم و کاهش آنها می‌گردد (Kristinsson and Rasco, 2000; Nilsang et al., 2005; Wasswa et al., 2007). براساس اطلاعات شرکت سازنده، دمای بهینه برای آنزیم آلکالاز در pHهای قلیایی بین ۵۸-۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Novozyme, 2011).

همچنین در آزمایش حاضر مشخص گردید که افزایش نسبت آنزیم به سویسترا با افزایش درجه آبکافت و سپس کاهش همراه است. یکی از نکات مهم در واکنش‌های کاتالیز شده آنزیمی این است که همچون سایر واکنش‌های شیمیایی

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی (جدول ۲) نشان می‌دهد که میزان پروتئین در پودر پروتئین آبکافت شده، ۸۵/۲۶ درصد است. این میزان در واقع نوعی غنی‌سازی پروتئین به حساب می‌آید و مشابه نتایج سایر محققان است که میزان مناسب درصد پروتئین در پروتئین آبکافت شده آبیان را بین ۶۳ تا ۹۰ درصد گزارش کردند (Bhaskar et al., 2008; Diniz and Martin, 1997; Kristinsson and Rasco, 2000; Ovisipour et al., 2009). در این آزمایش میزان چربی کاهش یافت که می‌تواند به علت شکسته شدن باندهای پپتیدی و سانتریفوژ نمونه‌ها باشد که باعث می‌شود چربی به پروتئین‌های نامحلول متصل شده و همراه آن رسوب کند (Kristinsson and Rasco, 2000; Ovisipour et al., 2009;) (Shahidi et al., 1995). میزان خاکستر پودر پروتئینی نیز افزایش یافت که علت این امر، افزایش ماده خشک و نیز کاربرد اسیدکلریدریک و هیدروکسیدسدیم برای تنظیم pH در طی واکنش است (Chalamaiah et al., 2012)، زیرا در

به علت این است که بهترین دما برای فعالیت آنزیم آلکالاز ۵۵ درجه سانتی‌گراد است.

با توجه به جدول ۶ درباره شاخص‌های L^* ، a^* و b^* و این‌که مقادیر L^* از ۰ تا ۱۰۰ و a^* و b^* از -۶۰ تا ۶۰ است (Mendozaa, 2006)، می‌توان بیان کرد که پودر پروتئینی ماهی مرکب دارای روشنایی بالا، قرمزی و زردی پایینی است. در مقایسه با پودر پروتئینی تولیدشده از ماهی کفشک تیز دندان (*Atheresthes stomias*)، در مطالعه Sathivel و Bechtel (2008)، این پودر دارای روشنایی بیشتر از ماهی کفشک تیز دندان بود و شاخص قرمزی آن تقریباً برابر با آن و شاخص زردی پودر پروتئینی این مطالعه کمتر از پودر پروتئینی ماهی کفشک تیز دندان بود. همچنین Balti و همکاران (2011) در مطالعه خود بر روی پروتئین آبکافت شده ماهی مرکب (*Sepia officinalis*) با استفاده از آنزیم آلکالاز، رنگ پودر پروتئینی حاصل از آبکافت آنزیمی را سفید متمایل به زرد روشن بیان کردند که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. با توجه به این‌که پودر پروتئینی به‌دست آمده، محلول در آب بوده و قسمت پروتئین نامحلول در هنگام سانتریفوژ از محلول جدا شد و این‌که پودر پروتئینی، چربی کمی دارد، می‌توان روشنایی و سفیدی پودر پروتئینی حاصل از سر و بازوی ماهی مرکب را، حذف مواد رنگی و چربی آن دانست.

با توجه به این‌که با افزایش درجه آبکافت، پپتیدهای کوچک‌تری حاصل شده و با کوچک‌تر شدن پپتیدها، حلالیت بیشتر می‌شود (Kristinsson and Rasco, 2000)، می‌توان حلالیت ۶۴/۶ درصدی پروتئین آبکافتی حاصل از آزمایش حاضر را به‌علت درجه آبکافت آن دانست. Balti و همکاران (2011) در مطالعه خود بر روی پروتئین آبکافت‌شده ماهی مرکب (*Sepia officinalis*) نیز، افزایش حلالیت را در نتیجه افزایش درجه آبکافت در pHهای

باید از قوانین ترمودینامیک پیروی کنند. به‌ویژه واکنش تنها در صورتی پیش می‌رود که با یک کاهش سطح انرژی آزاد اصلی همراه باشد. در نتیجه غلظت آنزیم به سوبسترا باید در سطح مشخصی باشد تا واکنش انجام گیرد و میزان فراورده نهایی بهینه باشد (Barman, 1969). بنابراین با افزایش غلظت سوبسترا، آنزیم اشباع شده و فعالیت آنزیم به سمت حداکثر پیش می‌رود. اما همیشه افزایش میزان سوبسترا دلیل بر کارایی بیشتر نیست و در مطالعات کینتیک آنزیمی یک رابطه برهم‌کنشی بین میزان آنزیم و مقدار سوبسترا برقرار است و در یک نقطه یا محدوده بهینه کارایی آنزیم حداکثر خواهد بود (Palmer, 1981). این مسئله می‌تواند توضیح دهد که چرا افزایش بیشتر میزان آنزیم مصرفی نمی‌تواند به تولید پروتئین با حداکثر درجه آبکافت منجر شود. در مطالعه Ovisipour و همکاران (2012) بر روی بهینه‌یابی آبکافت ضایعات تن زردباله نیز کاهش فعالیت آنزیم با افزایش میزان آنزیم بیان شد.

pH سوبسترا نیز بر ساختار و فعالیت آنزیم اثرگذار است. برای مثال، pH می‌تواند بر حالت یونیزاسیون آمینواسیدهای اسیدی و بازی اثر بگذارد. آمینواسیدهای اسیدی دارای گروه عاملی کربوکسیل و آمینواسیدهای بازی دارای گروه عاملی آمین در زنجیره جانبی خود می‌باشند. اگر حالت یونیزاسیون آمینواسیدهای پروتئین تغییر کند، پیوندهای یونی که شکل سه‌بعدی پروتئین را تعیین می‌کنند، تغییر می‌یابند. این می‌تواند منجر به تغییر در پروتئین و غیرفعال شدن آنزیم گردد. این نتایج تقریباً مشابه با روند مشاهده شده در پژوهش See و همکاران (2011) بوده که بهینه‌یابی آبکافت آنزیمی پوست ماهی آزاد (*Salmo salar*) را به‌وسیله آنزیم آلکالاز انجام دادند. بالاترین درجه آبکافت با افزایش دما تا ۵۴/۳۳ درجه سانتی‌گراد و سپس کاهش آن،

با ظهور پپتیدهای آبدوست در طی آبکافت‌های بیشتر، تشکیل کف کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری کلی

روش سطح پاسخ یک روش ریاضی طراحی آزمایش‌ها، ساخت مدل‌ها، تعیین تأثیر چندین عامل و جستجوی شرایط بهینه برای پاسخ‌های لازم است. در این تحقیق بررسی نمودارها، ضریب تعیین کلی R^2 تعیین نبود برازش نشان داد که مدل محاسبه‌شده، از تناسب و اطمینان خوبی برای پیش‌بینی درجه آبکافت پروتئین سر و بازوی ماهی مرکب برخوردار است. بهینه پروتئین آبکافتی در این آزمایش طبق مدل پیش‌بینی شده با نرم‌افزار دارای درجه آبکافت برابر با ۱۴/۵ بود و در آزمایشی که برای صحت این عدد و انجام آنالیزهای خواص کاربردی انجام گرفت، برابر با ۱۶/۸ درصد به‌دست آمد که با هدف آزمایش در رسیدن به بالاترین درجه آبکافت، متناسب بود. اما نتایج حاصل از خواص کاربردی این پروتئین آبکافتی نشان از ضعف این پودر پروتئینی در خواص کاربردی و محدودیت استفاده از آن در صنایع غذایی دارد. با توجه به محتوای نیتروژنی مناسب آن می‌توان مطالعاتی بر روی استفاده از آن در محیط کشت باکتریایی انجام و از آن در تولید محیط کشت استفاده کرد و یا بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پودر پروتئین تولیدشده به‌منظور تولید محصول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان گام برداشت.

منابع

AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists International. Washington DC. 18th ed. 238p.

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

خارج از نقطه ایزوالکتریک به‌دست آوردند که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. با توجه به این نتایج می‌توان چنین استنباط کرد که پپتیدهای کوچک‌تر دارای نقاط قطبی به نسبت بیشتری هستند که توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی با آب را دارند و این موضوع باعث افزایش حلالیت پپتیدهای کوچک‌تر در آب می‌شود.

ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین آبکافت‌شده ماهی مرکب، برابر با ۵ درصد بود. در مطالعه Souissi و همکاران (2007)، ظرفیت امولسیون‌کنندگی برای پروتئین آبکافتی از پوست ماهی ساردین با درجه آبکافت‌های ۶/۶۲، ۹/۳۱ و ۱۰/۱۶ درصد به‌ترتیب ۲۰، ۱۵/۲ و ۱۰/۸ درصد به‌دست آمدند که نشان از کاهش ظرفیت امولسیون‌کنندگی با افزایش درجه آبکافت دارد. در این مطالعه بیان شد که کاهش فعالیت امولسیون‌کنندگی در آبکافت‌های بالاتر در اصل به‌علت کاهش ویژگی آب‌گریزی آن و تغییر در اندازه پپتید در طول فرایند آبکافت است. رابطه‌ای مستقیم بین فعالیت سطحی و طول پپتید بیان شده است (Jost and Monti, 1977). به‌طوری‌که پپتیدهای کوچک‌تر اغلب خواص امولسیون‌کنندگی را کاهش می‌دهند.

ظرفیت کف‌کنندگی ۱۵ درصد، در پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب، نشان از ضعف این پروتئین در خصوص ویژگی کف‌کنندگی دارد، به‌طوری‌که Balti و همکاران (2010) در مطالعه بر روی ضایعات ماهی مرکب (*Sepia officinalis*) این مقدار را بین ۶۵ تا ۸۰ درصد به‌دست آوردند. براساس بسیاری از یافته‌ها بین درجه آبکافت و خواص کف‌کنندگی ارتباط نزدیکی وجود دارد. Souissi و همکاران (2007)، بیان داشتند که افزایش میزان آبکافت به‌علت کوچک‌تر شدن اندازه پپتیدها، مانع از تشکیل یک غشای مقاوم اطراف حباب‌های گاز می‌شود و همچنین

- Harnedy, P. A. and FitzGerald, R. J. 2012.** Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 6-24.
- Hoyle, N. T. and Merritt, J. 1994.** Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of food science*, 59(1): 76-79.
- Jost, R. and Monti, J. 1977.** Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. *Journal of dairy science*, 60: 1387-1393.
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000.** Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40: 43-81.
- Ktari, N. Fakhfakh, N. Balti, R. Khaled, H. B. Nasri, M. and Bougatef, A. 2013.** Effect of Degree of Hydrolysis and Protease Type on the Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates From Cuttlefish (*Sepia officinalis*) By-Products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22: 436-448.
- Layne, E. 1957.** Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in enzymology*, 3: 447-454.
- Mendozaa, F. Dejmekb, P. Aguileraa, J. 2006.** Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. *Journal of Postharvest and Biology and Technology*, 41(3):285-295
- Mullally, M. M. O'Callaghan, D. M. FitzGerald, R. J. Donnelly, W. J. and Dalton, J. P. 1994.** Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatin protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2973-2979.
- Nalinanon, S. Benjakul, S. Kishimura, H. and Shahidi, F. 2011.** Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124(4), 1354-1362.
- Nilsang, S. Lertsiri, S. Suphantharika, M. and Assavanig, A. 2005.** Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of food Engineering*, 70: 571-578.
- Novozymes, 2001.** Alcalase 2.4L[®] application sheet. Novozymes A/S, Denmark.
- Onodenaloro, A. C. and Shahidi, F. 1996.** Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus* Balti, R. Bougatef, A. El Hadj Ali, N. Ktari, N. Jellouli, K. Nedjar-Arroume, N. Dhulster, P. and Nasri, M. 2011. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by Alcalase and Bacillus licheniformis NH₁ proteases. *Journal of amino acids*, 2011: 0-11.
- Balti, R. Bougatef, A. El Hadj Ali, N. Zekri, D. Barkia, A. and Nasri, M. 2010.** Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12): 2006-2014.
- Barman, T. E. 1969.** Enzyme handbook, Berlin Heidelberg. New York: Springer. Vol 2. 508p.
- Bhaskar, N. Benila, T. Radha, C. and Lalitha, R. G. 2008.** Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99 (2): 335-343.
- Chalamaiah, M. Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T. 2012.** Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food chemistry*, 135(4): 3020-3038.
- Diniz, F. M. and Martin, A. M. 1997.** Optimisation of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: composition of the hydrolysates. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 48: 191-200.
- FAO. 2013.** Food and Agricultural Organization Yearbook, Fishery Statistics. Catches and Landings. [Online]. Available: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/en>.
- Haltrich, D. Laussmayer, B. Steiner, W. Nidetzky, B. and Kulbe, K. D. 1994.** Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes of Sclerotium rolfsii: Optimization of the culture medium and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Bioresource Technology*, 50: 43-50.
- Hamzeh, A. Rezaei, M. Khodabandeh, S. Motamedzadegan, A. Norozinia, M. 2016.** Optimization of Persian Gulf cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle hydrolysate production by RSM. *Fisheries Science & Technology*, 5(1): 69-82. (Abstract in English)

- See, S. F. Hoo, L. L. and Babji, A. S. 2011.** Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *International Food Research Journal*, 18(4): 1359-1365.
- Shahidi, F. Han, X. Q. and Syniowiecki, J. 1995.** Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53: 285-293.
- Šližytė, R. Mozuraitytė, R. Martínez-Alvarez, O. Falch, E. Fouchereau-Peron, M. and Rustad, T. 2009.** Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44(6): 668-677.
- Souissi, N. Bougatef, A. Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. 2007.** Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45: 187-194.
- Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N. A. A. Q. 2000.** The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp (*Crangon crangon*) processing discards. *Food chemistry*, 68(2):147-152.
- Valinasab, T. 1999.** Species diversity of *Sepia pharaonis* in the Persian Gulf and Oman Sea. PhD Dissertation. Islamic Azad University, Science and Research Branch. Tehran. 165.
- Wasswa, J. Tang, J. G. U, X-H. and Yuan, X-Q. 2007.** Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 104: 1698-1704.
- oxyrinchus). Journal of Aquatic Food Product Technology**, 5: 43-59.
- Ovissipour, M. Abedian, A. Motamedzadegan, A. Rasco, B. Safari, R. and Shahiri, H. 2009.** The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242.
- Ovissipour, M. Kenari, A. A. Motamedzadegan, A. and Nazari, R. M. 2012.** Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food and bioprocess technology*, 5: 696-705.
- Ovissipour, M. Safari, R. Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B. 2012.** Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2): 460-465.
- Palmer, T. 1985.** Understanding Enzymes. Ellis Horwood Series in Biochemistry and Biotechnology, Ellis Horwood Ltd. 2th Ed. 412p.
- Safari, R. Motamedzadegan, A. Ovissipour, M. Regenstein, J. M. Gildberg, A. and Rasco, B. 2012.** Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 73-79.
- Sathivel, S. and Bechtel, P. J. 2008.** A comparison of physical and rheologic properties of arrowtooth flounder protein made using three different extracting processes. *Journal of food biochemistry*, 32: 557-575.

Optimization of protein hydrolysate from head and arms of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) by alcalase enzyme

Kayvan Ali Asgari¹, Sakineh Yeganeh^{2*}, Seyed Ali Jafar Pour³, Reza Safari⁴

1- M.Sc. Graduate, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2- Associate Professor, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

3- Associate Professor, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

4- M.Sc. Graduate, Iranian Fisheries Research Organization, Caspian Sea Ecology Research Center, Sari, Iran

Received: 10.11.2015 Accepted: 28.01.2017

*Corresponding author: skyeganeh@gmail.com

Abstract:

Optimization of protein hydrolysate from head and arms of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) was examined. For this purpose, response surface methodology (RSM) was employed to investigate the effects of different operating conditions on hydrolysis process of cuttlefish protein by the application of alcalase enzyme. A Box-Behnken design with three factors at three levels was used for hydrolysis optimization and to check any individual or interaction effects between the experimental factors. In this method, the effects of three independent variables, including temperature, pH and enzyme to substrate ratio, were investigated on hydrolysis rate as a surface response. The mathematical model showed a good fitness with experimental data. Optimum conditions for temperature, pH and enzyme quantity were determined as 54.33 °C, 8.49 and 1.97 %, respectively, which caused nearly 14.5 % hydrolysis degree. Based on the lack of fitness factor which was not significant, it was deduced that the resulted model was capable of prediction at different studied levels of variables. In this study, in order to confirm the conditions that proposed by mathematical equation, the hydrolyzed protein was produced accordingly at which resulted in a 16.8% hydrolysis degree. This finding was according to the aim of present trial by producing a protein hydrolysate with maximum hydrolysis degree. Then the functional properties of protein hydrolysate powder from optimized conditions were measured. Functional properties of this protein powders indicated a good solubility, but weak levels of emulsifying and foaming capacities.

Key Words: Optimization, Protein hydrolysate, Alcalase, Cuttlefish (*Sepia pharaonis*), Functional properties