بررسی ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های عملکردی پروتئین ایزوله شده از فانوس-ماهی (*Benthosema pterotum*) با استفاده از روش تغییر pH

نجمه اولیائی[۱]، مرضیه موسوی‌نسب[۲]*، محمد قربانی[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۱]، یحیی مقصودلو[۱]

* marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca

۱-گروه کشاورزی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- گروه پژوهشی فراوری آبزیان ، بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

چکیده

هدف از این تحقیق تولید ایزوله پروتئینی از فانوس‌ماهی (*Benthosema pterotum*) و بررسی ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های عملکردی آن بود. ایزوله پروتئین ماهی با روش تغییر pH با استفاده از pH های قلیایی (۱۰ و ۱۲) تولید گردید. نتایج نشان دادند که راندمان استخراج پروتئین در pH ۱۲ به شکل معنی‌داری بیشتر از pH ۱۰ بود. نتایج حاصل از تعیین مقدار چربی نمونه‌ها نشان داد قلیا اثر معنی‌داری بر کاهش چربی ایزوله‌های پروتئینی داشت و با افزایش pH میزان چربی به شکل معنی‌داری کاهش یافت. بررسی ویژگی‌های عملکردی از قبیل ظرفیت حفظ آب، حفظ روغن، خاصیت امولسیفایری، کف-کنندگی و حلالیت ایزوله‌های پروتئینی نیز نشان داد با افزایش pH ویژگی‌های عملکردی بهبود یافته و پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲ نسبت به pH ۱۰ برتری داشت. بررسی و مقایسه خصوصیات رنگی (L، a و b) پروتئین‌های ایزوله شده نشان داد پروتئین‌های ایزوله شده در pH ۱۲ رنگ روشن‌تری (پارامتر L بالاتر) نسبت به پروتئین‌های ایزوله شده در pH ۱۰ داشتند. همچنین با افزایش pH میزان قرمزی (پارامتر a) و زردی (پارامتر b) ایزوله‌های پروتئینی کاهش یافت. نتایج فوق نشان داد ایزوله پروتئین فانوس ماهی تولید شده دارای ویژگی‌های عملکردی مناسبی است و استفاده از قلیا منجر به بهبود عملکرد و پارامترهای رنگی ایزوله پروتئینی می‌شود.

لغات کلیدی : فانوس‌ماهی (*Benthosema pterotum*)، ایزوله پروتئین ماهی، قلیا، ویژگی‌های عملکردی

*نویسنده مسئول

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

هر ساله میلیون‌ها تن ماهی صید می‌شود که تقریبا ۲۹/۵ درصد از آن به خوراک دام تبدیل می‌گردد. این درحالیکه است که ماهی یک منبع غنی از پروتئین‌های با کیفیت و اسیدآمینه‌های ضروری است که می‌تواند در اختیار انسان قرار گیرند. یکی از روش‌های استفاده بهینه از ماهی‌های کوچک، استخراج پروتئین و تولید محصولی با درصد بالای پروتئین است (معتمدزادگان و همکاران، ۱۳۸۸). استخراج پروتئین می‌تواند به روش‌های مختلفی از جمله استفاده از قلیا و رسوب در نقطه ایزوالکتریک صورت گیرد. در این روش ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها بهبود می‌یابد همچنین راندمان تولید بالا است و با کاهش موثر چربی، پایداری محصول نسبت به اکسیداسیون نیز افزایش می‌یابد (شویک‌لو، ۲۰۰۶). پروتئین ایزوله شده حاصل از این روش می‌تواند جهت افزایش ارزش تغذیه‌ای و بهبود ویژگی‌های عملکردی در محصولات غذایی با هدف تولید محصولات با ارزش افزوده استفاده شود. یکی از ماهی‌های کوچک و کم ارزش فانوس‌ماهی‌ها از خانواده میکتوفیده هستند که در ناحیه مزوپلاژیک اقیانوس‌های جهان پراکنده شده‌اند و از پلانکتون‌ها تغذیه می‌کنند (چای و همکاران، ۲۰۱۲؛ دیپویک و کارتوت، ۲۰۱۲). میکتوفیدها از زمان‌های بسیار قدیم در دنیا حضور داشته‌اند، به مرور زمان رشد و نمو کرده‌اند و با تغییرات محیطی سازگار شده‌اند (کچول و همکاران، ۲۰۱۱). فانوس‌ماهی‌ها، ماهی‌های کوچکی(۲-۱۵سانتی‌متر) هستند که تقریبا ۲۳۰-۲۵۰ گونه در ۳۲-۳۰ جنس دارند (سازمان خواربار و کشاورزی، ۲۰۰۱). علت نامگذاری فانوس‌ماهی وجود لکه‌های نوری روی قسمت شکمی این ماهیان است که از این اندام‌ها برای دیدن در تاریکی، جفت‌گیری و فریب دادن صیادان استفاده می‌کنند (وانگ و چن، ۲۰۰۱). مهمترین گونه‌های میکتوفیده در دریای عمان فانوس‌ماهی *Benthosema pterotum*می‌باشد که در سراسر دریای عمان پراکنده شده است (ولی‌نسب و همکاران، ۲۰۰۷). این ماهیان منابع مهمی از پروتئین، لیپید و مواد معدنی هستند (کچول و همکاران، ۲۰۱۱).

هدف از این تحقیق تولید ایزوله پروتئین از فانوس-ماهی به روش تغییر pH و رسوب در نقطه ایزوالکتریک و بررسی ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های عملکردی ایزوله-های پروتئینی است.

مواد و روش‌ها

فانوس‌ماهی (*Benthosema pterotum*) از دریای عمان صید و به صورت منجمد به بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز منتقل گردید و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. قبل از استخراج، ماهی‌های منجمد در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) انجماد زدایی شدند سپس با چرخ‌گوشت (با قطر ۴ میلی‌متر) چرخ گردید. برای استخراج پروتئین‌ها در شرایط قلیایی ابتدا گوشت چرخ شده ماهی با ۶ برابر وزنی آب مخلوط و در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) هموژن گردید. سپس با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۵ نرمال pH روی ۱۰ و ۱۲ تنظیم شد. پس از انحلال کامل پروتئین‌ها، از سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه (۴ درجه سانتی‌گراد) برای رسوب و جداسازی مواد ناخالصی مانند پوست، استخوان، فلس و ناخالصی‌ها استفاده شد سپس بخش محلول جدا شد و pH آن روی pH ایزوالکتریک پروتئین‌های ماهی در نقطه ۵ تنظیم گردید تا پروتئین‌های ماهی رسوب کردند. سپس از سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۱۰ دقیقه برای جداسازی پروتئین‌ها که همان پروتئین ایزوله شده است، استفاده گردید. بعد از جداسازی آب اضافی نمونه‌ها با اعمال فشار مکانیکی، آن‌ها را در کیسه‌های زیب‌دار قرار داده و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگه-داری شدند (Davenport & Kristinsson, 2011). در این تحقیق از پروتئین کازئین به عنوان پروتئین مرجع استفاده گردید.

ترکیبات شیمیایی (رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر) نمونه‌ها طبق دستورالعمل‌های AOAC (۲۰۰۵) اندازه-گیری شدند.

راندمان استخراج بر اساس وزن نمونه ایزوله شده نسبت به وزن ماده اولیه محاسبه شد (Sathivel *et al*., 2004).

www.SID.ir

درصد کاهش چربی ایزوله‌های پروتئینی مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{کاهش چربی \٪} = \frac{\text{مقدار چربی محصول} - \text{مقدار چربی ماهی استفاده شده}}{\text{مقدار چربی ماهی استفاده شده}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری ظرفیت حفظ آب

یک گرم از هر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و بعد از ۳۰ ثانیه ورتکس کردن، به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس حجم سوپرناتنت اندازه‌گیری شد. ظرفیت نگه‌داری آب بر اساس میلی‌لیتر آب جذب شده به ازای گرم پروتئین نمونه بیان شد. (Foh *et al.*, 2010).

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

اندازه‌گیری ظرفیت حفظ روغن

یک گرم از هر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر روغن سویا مخلوط و بعد از ۳۰ ثانیه ورتکس کردن، به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ روغن اضافه دور ریخته شد و ظرفیت حفظ روغن بر اساس اختلاف وزن نمونه‌ها قبل و بعد از سانتریفوژ محاسبه گردید(Foh *et al.*, 2010).

اندازه‌گیری ظرفیت تشکیل امولسیون

مطابق با روش Foh و همکاران (۲۰۱۰) با کمی تغییر، ۵ میلی‌لیتر روغن سویا با ۵ میلی‌لیتر از محلول ۱ درصد ایزوله پروتئین ماهی با استفاده از هموژنایزر آزمایشگاهی با ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق هموژن شد. سپس با ۲۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس حجم هر یک از اجزا (آب، روغن، امولسیون) اندازه‌گیری شد. ظرفیت تشکیل امولسیون بر اساس میلی‌لیتر روغن امولسیون شده به گرم نمونه ایزوله پروتئین بیان شد.

$$\text{ظرفیت تشکیل امولسیون \٪} = \frac{\text{حجم روغن امولسیون شده}}{\text{گرم نمونه ایزوله پروتئین ماهی}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری ظرفیت تشکیل کف

جهت اندازه‌گیری ظرفیت تشکیل کف از روش Martin & Diniz (۱۹۹۷) با کمی تغییراستفاده شد. در این روش محلول ۱۰ گرم بر لیتر از ایزوله‌های پروتئینی تهیه گردید سپس با هموژنایزر آزمایشگاهی با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق هموژن شد. حجم نهایی بعد از ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. تفاوت حجم به عنوان حجم کف بیان شد.

اندازه‌گیری حلالیت پروتئین‌ها

حلالیت پروتئین مطابق با روش Souissi و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول (۱۰ گرم بر لیتر) از نمونه‌ها تهیه شد و سپس سوسپانسیون‌ها از pH ۲ تا ۱۲ با استفاده از محلول اسید کلریدریک ۰/۱ مولار و محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار تنظیم شدند. محلول‌ها به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق ورتکس شدند. سپس با سرعت ۲۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. میزان پروتئین محلول در سوپرناتنت با استفاده از روش بیورت اندازه‌گیری شد. جهت رسم منحنی استاندارد نیز از پروتئین آلبومین سرم گاوی استفاده شد. حلالیت پروتئین مطابق معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{حلالیت پروتئین} = \frac{\text{میزان پروتئین در سوپرناتنت (میلی‌گرم)}}{\text{میزان پروتئین در نمونه اولیه (میلی‌گرم)}}$$

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی رنگ پروتئین‌های ایزوله شده

برای ارزیابی رنگ، نمونه‌ها در جعبه مکعب شکل با دیواره‌های سفید با ابعاد ۵۰ سانتیمتر قرار داده شدند. درون جعبه از یک لامپ فلورسنت کم مصرف با توان ۲۰ وات با نور سفید استفاده گردید. توزیع نور درون جعبه کاملا یکنواخت بود. عکسبرداری توسط یک دوربین دیجیتال با وضوح تصویر ۱۶ مگاپیکسل، با فاصله ۳۰ سانتیمتری و عمود بر آن درون جعبه انجام گردید. سپس تصویر بدست آمده به نرم افزار فتوشاپ (CS3) منتقل شد و مولفه‌های رنگ (L، a وb) آن‌ها بدست آمد. مولفه رنگ L بیانگر روشنی، مولفه رنگ a نشان‌دهنده میزان سبزی و قرمزی و مولفه رنگ b نشانگر میزان آبی و زردی می‌باشد. سپس این مولفه‌ها برای آنالیز آماری استفاده شدند.

روش آماری

در این تحقیق آنالیز داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و در ۳ تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) یکطرفه در سطح احتمال ($p < ۰/۰۵$)مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت گرفت. همچنین جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها از Shapiro-Wilk استفاده شد.

نتایج

ترکیبات شیمیایی

در جدول ۱ ترکیبات شیمیایی (رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر) ایزوله‌های پروتئینی، ماهی چرخ شده و پروتئین کازئین (به عنوان پروتئین مرجع) بر حسب درصد (بر حسب ماده خشک) بیان شده است.

جدول ۱: ترکیبات شیمیایی ماهی چرخ شده، پروتئین‌های ایزوله و پروتئین مرجع کازئین

نمونه	رطوبت (٪)	پروتئین (dw٪)	چربی (dw٪)	خاکستر (dw٪)
ماهی چرخ شده	۷۵/۳۴ ± ۰/۲۴ [a]	۶۹/۶۶ ±۱/۹۵[d]	۳/۲۱ ± ۰/۱۶ [a]	۵/۱۸ ± ۰/۲۷ [a]
پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰	۷/۳۰ ± ۰/۳۶ [b]	۷۹/۵۰ ± ۱/۱۷ [c]	۲/۰۵ ± ۰/۱۳ [b]	۲/۴۳ ± ۰/۲۳[b]
پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲	۷/۶۱ ± ۰/ ۲۷ [b]	۸۴/۸۹± ۱/۲۸ [b]	۱/۵۰ ± ۰/۱۹[c]	۱/۹۴ ± ۰/۲۶[c]
کازئین	۷/۴۵ ± ۰/۱۸ [b]	۸۷/۶۲± ۱/۰۵ [a]	۰/۹۷ ± ۰/۲۲[d]	۱/۷۵ ± ۰/۲۱[c]

* حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P \leq ۰/۰۵$).

* نتایج میانگین (± انحراف استاندارد) داده‌ها در ۳ تکرار می‌باشد.

* Dry weight (dw)

مطابق با نتایج جدول ۱ تفاوت معنی‌داری در میزان چربی پروتئین‌های ایزوله شده در مقایسه با نمونه ماهی مشاهده شد ($F=۸۵/۶۷,d.f=۳ ,P= ۰/۰۰۰۱$). نتایج نشان داد قلیا اثر معنی‌داری بر میزان چربی ایزوله‌های پروتئینی داشت و بیشترین کاهش درصد چربی در پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲ مشاهده شد. مطابق با جدول ۱، پروتئین‌های استخراج شده از فانوس‌ماهی در pHهای ۱۰ و ۱۲ حاوی خاکستر کمتری نسبت به ماهی بودند ($F=۱۲۸/۴۹,d.f=۳ ,P= ۰/۰۰۰۱$).

راندمان استخراج پروتئین

بررسی آماری نتایج راندمان استخراج پروتئین (جدول ۲) نشان می‌دهد اثر pHهای قلیایی (در دو سطح) جهت استخراج پروتئین در سطح احتمال (P= ۰/۰۰۰۲,

www.SID.ir

F=۱۸۲/۱۰,d.f=۱) معنی‌دار بود. نتایج نشان داد pH ۱۲ با میزان میانگین (±SD) استخراج ۰/۵۴±۴۸/۶۳٪ قدرت استخراج‌کنندگی بیشتری نسبت به pH ۱۰ (۰/۸۵±۲۹/۰۹٪) دارد.

جدول ۲: میانگین (±SD) راندمان استخراج پروتئین در دو pH ۱۰ و ۱۲

نمونه	pH	راندمان استخراج (٪)
پروتئین ایزوله شده	۱۰	۲۹/۰۹ ±۰/۸۵ [b]
پروتئین ایزوله شده	۱۲	۴۸/۶۳ ± ۰/۵۴ [a]

* حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p ≤ ۰/۰۵).

درصد کاهش چربی

جدول ۳ میزان کاهش چربی در پروتئین‌های ایزوله شده در pHهای قلیایی را نشان می‌دهد. مطابق با نتایج استفاده از قلیا منجر به کاهش قابل توجهی در میزان چربی نمونه-ها شد. بیشترین میزان میانگین (±SD) کاهش چربی در پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲ (۵/۹۹± ۵۳/۱۷٪) مشاهده شد.

جدول ۳: میانگین (±SD)کاهش چربی نمونه‌های پروتئین ایزوله شده ماهی

نمونه	pH	کاهش چربی (٪)
پروتئین ایزوله شده	۱۰	۳۶/۰۳ ±۴/۰۷ [b]
پروتئین ایزوله شده	۱۲	۵۳/۱۷ ± ۵/۹۹ [a]

* حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p ≤۰/۰۵).

ظرفیت حفظ آب

ظرفیت حفظ آب پروتئین‌های ایزوله شده در pHهای قلیایی و پروتئین کازئین به عنوان پروتئین مرجع در جدول ۴ آمده است. بررسی آماری نتایج نشان داد اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت حفظ آب پروتئین‌ها وجود داشت و با افزایش pH ظرفیت حفظ آب پروتئین‌های ایزوله شده افزایش یافت. از بین ایزوله‌های پروتئینی، نمونه تهیه شده در pH ۱۲ به شکل معنی‌داری ظرفیت نگه‌داری آب بیشتری نسبت به پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰ داشت. ظرفیت نگه‌داری آب پروتئین‌های ایزوله شده در هر دو pH نسبت به پروتئین کازئین کمتر بود (P= ۰/۰۰۰۵, F=۳۵/۳۱ ,d.f=۲).

جدول ۴: میانگین (±SD) ظرفیت حفظ آب پروتئین‌های ایزوله شده در pH ۱۰ و ۱۲ و پروتئین کازئین

نمونه	ظرفیت حفظ آب (ml/g)
پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰	۲/۸۳ ±۰/۲۹ [c]
پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲	۳/۶۶ ±۰/۲۹[b]
پروتئین کازئین	۴/۴۷ ± ۰/۰۵ [a]

*حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p ≤۰/۰۵).

Archive of SID
www.SID.ir

ظرفیت حفظ روغن

نتایج ظرفیت حفظ روغن پروتئین‌های ایزوله شده در pHهای قلیایی و پروتئین کازئین در جدول ۵ آمده است.

مطابق با نتایج ظرفیت حفظ روغن پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲ نسبت به پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰ برتری داشت اگرچه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین ظرفیت حفظ روغن ایزوله‌های پروتئینی در هر دو pH با اختلاف معنی‌داری بیشتر از پروتئین کازئین بود. کمترین ظرفیت حفظ روغن در پروتئین کازئین مشاهده گردید ($F=۴۱/۶۰,d.f=۲ ,P= ۰/۰۰۰۳$).

جدول ۵: میانگین(±SD) ظرفیت حفظ روغن پروتئین‌های ایزوله شده در دو pH ۱۰ و ۱۲، پروتئین کازئین

نمونه	ظرفیت حفظ روغن (ml/g)
پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰	۲/۸۱±۰/۲۸ [a]
پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲	۳/۲۲ ± ۰/۱۶ [a]
پروتئین کازئین	۱/۵۶ ± ۰/۲۳ [b]

*حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p \leq ۰/۰۵$).

ظرفیت تشکیل امولسیون

نتایج حاصل از بررسی ظرفیت تشکیل امولسیون پروتئین-های ایزوله شده در جدول ۶ بیان شده است. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد پروتئین ایزوله شده در pH۱۲ ظرفیت تشکیل امولسیون بیشتری نسبت به پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰ داشت گرچه تفاوت معنی-داری بین ظرفیت تشکیل امولسیون پروتئین‌های ایزوله شده در هر دو pH مشاهده نشد ($P= ۰/۱۷۸۰, F=۲/۳۳,d.f=۲$). بررسی نتایج نشان داد بین پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰ و پروتئین کازئین نیز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بیشترین و کمترین ظرفیت تشکیل امولسیون به ترتیب در پروتئین‌های ایزوله شده در pH ۱۲ و ۱۰ مشاهده گردید.

جدول ۶: میانگین ظرفیت تشکیل امولسیون و تشکیل کف پروتئین‌های ایزوله شده در pHهای ۱۰ و ۱۲ و پروتئین کازئین

نمونه	ظرفیت تشکیل امولسیون (ml/g)	ظرفیت تشکیل کف (٪)
پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰	۲۶/۶۶ ±۵/۷۷ [a]	۴۱/۶۷ ± ۷/۲۲ [b]
پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲	۳۶/۶۶ ± ۵/۷۷ [a]	۵۸/۳۳± ۷/۲۲ [ab]
پروتئین کازئین	۳۳/۳۳ ± ۵/۷۷ [a]	۷۵/۰۰± ۸/۶۶ [a]

* حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p \leq ۰/۰۵$).

ظرفیت تشکیل کف

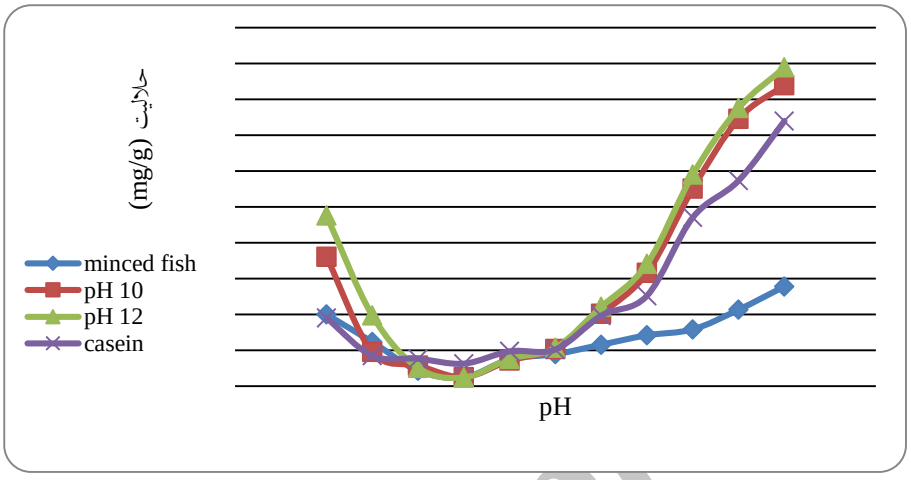
نتایج ظرفیت تشکیل کف پروتئین‌های ایزوله شده و پروتئین کازئین در جدول ۶ آمده است. مطابق با نتایج اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت تشکیل کف ایزوله‌های پروتئینی در دو pH ۱۰ و ۱۲ مشاهده نشد گرچه ظرفیت تشکیل کف پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲ بالاتر از pH ۱۰ بود. همچنین نتایج نشان داد پروتئین‌های ایزوله شده در pH های ۱۰ و ۱۲ نسبت به پروتئین کازئین ظرفیت تشکیل کف کمتری داشتند ($P= ۰/۰۱۳۵ ,F=۹/۶,d.f=۲$).

حلالیت پروتئین‌های ماهی

نمودار حلالیت پروتئین‌های ماهی، پروتئین‌های ایزوله شده در دو pH ۱۰ و ۱۲ و پروتئین کازئین در شکل ۱ نشان داده شده است. آنالیز آماری نتایج نشان داد پروتئین‌ها ایزوله شده حلالیت بیشتری نسبت به پروتئین-های ماهی داشتند ($P= ۰/۰۰۰۱ ,F=۴۲۹/۱۷,d.f=۳$). مطابق با نمودار در pHهای به شدت اسیدی و به شدت

www.SID.ir
Archive of SID

قلیایی حلالیت به شکل معنی‌داری افزایش یافت و کمترین حلالیت در pH ایزوالکتریک (۵) مشاهده شد. با بررسی آماری نتایج مشاهده شد پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲ نسبت به پروتئین ایزوله شده در pH ۱۰ حلالیت بیشتری داشت ($F=۴۱۷/۵۱, d.f=۲, P= ۰/۰۰۰۱$). در اطراف pH ایزوالکتریک (۴، ۵ و ۶) تفاوت معنی‌داری در حلالیت پروتئین‌های ایزوله شده مشاهده نشد.



شکل ۱: نمودار حلالیت پروتئین‌های ماهی چرخ شده، پروتئین‌های ایزوله شده در pH ۱۰ و ۱۲ و پروتئین کازئین

ارزیابی رنگ پروتئین‌های ایزوله شده

نتایج آنالیز رنگ نمونه‌ها در جدول ۷ آمده است. نتایج نشان داد پروتئین‌های ایزوله شده دارای رنگ روشنی هستند. مطابق با نتایج فاکتور L در پروتئین ایزوله شده در pH ۱۲ به شکل معنی‌داری افزایش یافت. همچنین تفاوت معنی‌داری در فاکتور a و b نمونه‌ها مشاهده نشد. مطابق با نتایج کمترین فاکتور a در pH ۱۲ مشاهده شد.

جدول ۷: مقایسه میانگین(±SD) فاکتورهای رنگ‌سنجی پروتئین‌های ایزوله شده

نمونه	L	a	b
۱۰pH	۴۶/۲۲±۱/۰۷ b	۲/۶۷±۰/۵۱ a	۳۴/۲۲±۱/۶۴ a
۱۲pH	۵۳/۳۳±۱/۳۳ a	۱/۶۷±۰/۳۳ a	۳۳/۳۳±۱/۲۰ a

* حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p \leq ۰/۰۵$).

بحث

در تحقیق حاضر میزان چربی ایزوله‌های پروتئینی نسبت به ماهی چرخ شده کمتر بود. دلیل کاهش چربی در نمونه‌ها را می‌توان به حذف موثر چربی‌ها در پایان سانتریفوژ مرحله اول نسبت داد (آزادیان و همکاران؛ ۱۳۹۰). زیرا در pHهای بالا، غشای سلولی از سطح پروتئین‌ها شکسته شده در نتیجه لیپیدها بر اساس اختلاف دانسیته و حلالیت در سانتریفوژ با سرعت بالا جداسازی می‌شوند(Kristinsson *et al.*, 2005؛ Davenport & Kristinsson,2011). با حذف غشاهای سلولی از پروتئین‌های ماهیچه، کیفیت پروتئین و پایداری نسبت به اکسیداسیون به شکل قابل توجهی افزایش می-

Archive of SID
www.SID.ir

یابد (Kristinsson & Liang, 2006؛ Chen & Jaczynski, 2007). نتایج مشابهی در تحقیقات Rawdkuen و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ماهی تیلاپیا و Chaijanو همکاران (۲۰۱۰) بر روی ماهی ماکرل گزارش شد. همچنین میزان خاکستر نمونه‌ها کاهش یافت که نشان‌دهنده حذف موثر ناخالصی‌ها در این روش است (Chen & Jaczynski, 2007).

دلیل پایین بودن راندمان استخراج این است که در حین استخراج مقادیر قابل توجهی از پروتئین‌ها از طریق بافت پیوندی در سانتریفوژ مرحله اول به صورت رسوب جداسازی می‌شوند همچنین بخشی کوچکی از پروتئین‌ها در سوپرناتنت حاصل از سانتریفوژ مرحله دوم نیز از دست می‌روند. بنابراین راندمان پایین استخراج پروتئین قابل توجیه است (Kristinsson *et al.*, 2005). در بررسی سایر گونه‌ها راندمان استخراج پروتئین از ماهی تیلاپیا، ماهی شوریده اقیانوس اطلس و گربه‌ماهی کانال در شرایط قلیایی به ترتیب ۷۹/۸۲٪ (Foh *et al.*, 2010)، ۶۵٪ (Kristinsson & Liang, 2006) و ۷۰/۳٪ (Kristinsson *et al.*, 2005) گزارش شد. در مطالعه‌ای نولسو و همکاران (۲۰۱۱) راندمان استخراج پروتئین نوعی ماهی در pH ۱۰/۸ را ۱/۷±۵۱/۱٪ گزارش کردند. با توجه به اینکه نوع گونه ماهی و نیروی سانتریفوژ بر میزان استخراج تاثیرگذار هستند می‌توان بیان کرد نتایج فوق از نظر روند افزایش استخراج پروتئین در pHهای بالا با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان مطابقت داشت.

دلیل افزایش ظرفیت حفظ آب ایزوله‌های پروتیئنی با افزایش pH ناشی از تغییراتی است که در ساختار پروتئین و گروه‌های باردار به وجود می‌آید که منجر به در سطح قرار گرفتن مناطق اتصال با آب می‌شود در نتیجه با افزایش قطبیت پروتئین، میزان اتصال با آب افزایش می‌یابد (Zayas, 1997). در بررسی سایر گونه‌های ماهی، فوه و همکاران (۲۰۱۰) پروتئین ماهی تیلاپیا را در pH ۱۱ استخراج کردند. نتایج آزمایش‌ها نشان داد پروتئین ایزوله شده دارای (ml/g) ۲/۵۱±۰/۵۷ ظرفیت حفظ آب می‌باشد. همچنین آزادیان و همکاران (۲۰۱۲) پروتئین ماهی کپور نقره‌ای را در دو pH ۱۱ و ۱۲ استخراج کردند. ظرفیت حفظ آب پروتئین‌های استخراج شده در pH های ۱۱ و ۱۲ به ترتیب (g/g) ۲/۸۵±۰/۱ و (g/g) ۲/۶۱±۰/۱۳ گزارش شد. نتایج فوق از نظر بررسی ظرفیت حفظ آب پروتئین‌های ایزوله شده مطابق با نتایج تحقیق حاضر بود.

بررسی نتایج ظرفیت حفظ روغن پروتئین‌های ایزوله شده نشان داد با افزایش pH ظرفیت حفظ روغن نیز بهبود یافت که ناشی از تغییرات ساختاری پروتئین‌ها در pHهای قلیایی است زیرا گروه‌های آبگریز به تدریج در سطح قرار می‌گیرند و به این شکل باعث بهبود ظرفیت حفظ روغن می‌شوند (He *et al.*, 2013). علاوه بر این به دلیل اینکه پروتئین‌ها دارای مقادیر پایینی چربی هستند می‌توانند درصد بالایی چربی جذب کنند (Pires *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای Foh و همکاران (۲۰۱۰) ظرفیت حفظ روغن پروتئین ایزوله شده ماهی تیلاپیا را (ml/g) ۳/۳۸±۰/۵۸ گزارش کردند.

خاصیت امولسیفایری پروتئین‌ها به دلیل وجود هر دو ناحیه آبدوست و آبگریز در ساختار پروتئین می‌باشد. این پروتئین‌ها در سطح بین فاز آب و روغن جذب شده و از طریق فعل و انفعال انتخابی با هر دو سطح، منجر به تثبیت آب و روغن می‌شوند و از دو فاز شدن جلوگیری می‌کنند (Jongh & Broersen, 2012). همچنین در فرایند ایزوله کردن، ممکن است قسمت‌هایی از تاخوردگی ساختار پروتئین باز و پروتئین دناتوره شود. این دناتوره شدن پروتئین منجر به باز شدن ساختار مارپیچی پروتئین شده و در نتیجه گروه‌های آبگریز در سطح قرار می‌گیرند (Pires *et al.*, 2012؛ Davenport & Kristinsson, 2011). نتایج مشابهی در تحقیقات Azadian و همکاران (۲۰۱۲) بر روی پروتئین‌های ایزوله شده از ماهی کپور نقره‌ای در pHهای ۱۱ و ۱۲ گزارش شد.

بررسی نتایج خاصیت کف‌کنندگی ایزوله‌های پروتئینی نشان داد با افزایش pH، ظرفیت تشکیل کف پروتئین‌ها افزایش یافت. تشکیل کف توسط پروتئین‌ها بر اساس پراکنده شدن پروتئین‌های محلول در فضای آب و هوا است که تحت تاثیر تغییرات ساختاری پروتئین‌ها می‌باشد. با افزایش pH بار خالص پروتئین‌ها نیز افزایش یافته و منجر به افزایش انعطاف‌پذیری پروتئین‌ها می‌شود در نتیجه پراکنده شدن پروتئین‌ها در سطح آب و هوا افزایش

www.SID.ir

یافته و میزان کف بیشتری تشکیل می‌شود (Foh *et al.*, 2010؛ Jongh & Broersen, 2012). تشکیل کف به منبع پروتئین و روش تهیه ایزوله پروتئین نیز بستگی دارد (Pires *et al.*, 2012). Foh و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای اثر pH بر ظرفیت تشکیل کف پروتئین ایزوله شده ماهی تیلاپیا را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها عنوان کردند تشکیل کف به pH بستگی دارد و با افزایش pH ظرفیت تشکیل کف بهبود می‌یابد.

افزایش حلالیت پروتئین‌ها در pHهای اسیدی یا قلیایی به دلیل افزایش بار مثبت یا بار منفی پروتئین‌ها است در نتیجه با افزایش نیروی دافعه بین رشته‌های پروتئینی، حلالیت نیز افزایش می‌یابد. در نقطه ایزوالکتریک به دلیل فقدان نیروی دافعه، پروتئین‌ها حداقل حلالیت را دارند که منجر به رسوب و ته نشینی پروتئین‌ها می‌شود (Palafox *et al.*, 2009).

الگوی حلالیت پروتئین‌های فانوس‌ماهی‌ها مشابه سایر گونه‌های ماهی از جمله گربه ماهی کانال (Kristinsson *et al.*, 2005)، ماهی شوریده (Kristinsson & Liang, 2006)، ماهی قزل‌آلای رنگین کمانی (Chen & Jaczynski, 2007) و ماهی تیلاپیا (Foh *et al.*, 2010) بود.

دلیل افزایش فاکتور L نمونه‌ها حذف بسیاری از پیگمان‌های تیره از قسمت‌های مختلف ماهی است (Pires *et al.*, 2012؛ Rawdkuen *et al.*, 2009) پارامتر رنگ a شاخص تمایل قرمزی- سبزی نمونه می‌باشد و هر چه پارامتر رنگ a بیشتر باشد، رنگ نمونه قرمزتر است. قرمز بودن نمونه‌ها به وجود رنگیزه‌هایی مانند هموگلوبین در محصول مرتبط است (آزادیان و همکاران، ۱۳۹۰). حقیقات بسیاری نشان داده حلالیت پروتئین‌های ماهی در pH قلیایی و رسوب در نقطه ایزوالکتریک منجر به بازیافت پروتئین با ویژگی‌های رنگی بهتری می‌شود (Kristinsson *et al.*, 2005؛ Kristinsson & Liang, 2006).

Kristinsson و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند در حین ایزوله کردن پروتئین در pH قلیایی، ساختار هموگلوبین باز و در نتیجه دناتوره شده که رنگ متمایل به زرد- قهوه‌ای دارد. این پروتئین‌های دناتوره شده ممکن است همراه با پروتئین‌های ماهیچه رسوب می‌کنند در نتیجه رنگ زرد (شاخص b) پروتئین‌های حاصل قابل توجیه است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت و همکاری‌های بی دریغ سازمان شیلات ایران و مدیریت شیلات فارس در اجرای این پروژه سپاسگزاری می گردد.

منابع

آزادیان، م.؛ موسوی‌نسب، م. و یوسفی، ع.، ۱۳۹۰. تولید سوریمی و پروتئین ایزوله از ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و بررسی تغییرات مولفه‌های رنگی و شیمیایی نمونه‌های ژل و پودر تولیدی از آن‌ها. مجله علمی شیلات ایران، سال بیستم، شماره ۳.

معتمدزادگان، ع.؛ شهیدی، ف.؛ مرتضوی، ع.؛ پورآذرنگ، ه.؛ حمزه، ش.؛ شهیدی یاساقی، ا.؛ قربانی حسن‌سرایی، آ.؛ خانی پور، ا.، ۱۳۸۸. اثر آنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی پروتئین های میوفیبریلار ماهی کیلکا. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد شانزدهم، شماره ۳.

AOAC, 2005. Official methods of analysis. In Horwitz, W, Latimer GW. (Eds). Association of official analytical chemists, incorporated. Maryland, U.S.A.

Azadian, M., Moosavi-Nasab, M. and Abedi, E., 2012. Comparison of functional properties and SDS-PAGE patterns between fish protein isolate and surimi produced from silver crap. European Food Research Technology, 235, 83-90.

Archive of SID

www.SID.ir

hydrolysate. LWT Food Science and Technology, 30, 266-272.

Dypvik E. and Kaartvedt S., 2012. Vertical migration and diel feeding periodicity of the skinnycheek lanternfish *(Benthosema pterotum)* in the Red Sea. Deep-Sea Research *I*, 72, 9-16.

FAO, 2001. Report of the trilateral workshop on Lanternfish in the Gulf of Oman. FAO Fisheries Report No. 665, FIIT/R665, ISSN 0429-9337.

Foh, M.B.K., Wenshui, X., Amadou, I. and Jiang Q., 2010. Influence of pH shift on functional properties of protein isolated of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscles and of soy protein isolate. Food Bioprocess Technology, 5(6).

He, S., Franco, C. and Zhang, W., 2013. Review: Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). Food Research International, 50, 289-297.

Jongh, H.H.J. and Broersen, K., 2012. Application potential of food protein modification, advances in chemical engineering. *In*: Zeeshan N (Ed.), http:// www. intechopen.com / books / advances-in-chemical-engineering/ chemical-engineering-of-proteinsto-provide-a- toolbox-to-study-functional-properties-of-proteins-in.

Kristinsson, H.G. and Liang T., 2006. Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker *(Micropogonias undulates*) muscle

Catul, V., Gauns, M. and Karuppasamy, P.K., 2011. A review on mesopelagic fishes belonging to family Myctophidae. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 21, 339-354.

Chai, H.J., Chan, Y.L., Li, T.L., Chen, Y.C., Wu, C.H., Shiau, C.Y. and Wu, C.J., 2012. Composition characterization of Myctophids (*Benthosema pterotum*): Antioxidation and safety evaluations for Myctophids protein hydrolysates. Food Research International, 46, 118-126.

Chaijan, M., Panpipat, W. and Benjakul, S., 2010. Physicochemical and gelling properties of short_bodies Mackerel (*Rastrelliger brachysoma*) protein isolate prepared using alkaline_ aided process. Food and Bioproducts processing, 88, 174–180.

Chen, Y.C. and Jaczynski, J., 2007. Protein recovery from rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) processing by-products via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties as affected by functional additives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(22), 9079-9088.

Davenport, M.P. and Kristinsson, H.G., 2011. Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle protein isolate performance processed under different acid and alkali pH values. Journal of Food Science, E240, 76, 3.

Diniz F.M. and Martin A.M., 1997. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of shark protein

Archive of SID
www.SID.ir

Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Prinyawiwatkul, W., Negulescu, I.I. and Reppond, K.D., 2004. Properties of protein powders from Arrowtooth Flounder (*Atheresthes stomias*) and Herring (*Clupea harengus*) byproducts. Fishery Industrial Technology Center in Kodiak, the School of Fisheries and Ocean Sciences of the University of Alaska Fairbanks. JF0351422.

Shaviklo, G.R., 2006. Quality assessment of fish protein isolates using surimi standard methods. The United Nations University, Fisheries Training Programme.

Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2007. Biochemical and functional properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. Food Technology Biotechnology, 45(2), 187-194.

Valinassab T., Pierce, G.J. and Johannesson K., 2007. Lanternfish *(Benthosema pterotum*) resources as a target for commercial exploitation in the Oman Sea. Journal of Application Ichthyology, 23, 573-577.

Wang J.T.M. and Chen C.T., 2001. A review of Lanternfishes (Families: *Myctophidae* and *Neoscopelidae*) and their distributions around Taiwan and the Tungsha islands with notes on seventeen new records. Zoological Studies, 40(2), 103-126.

Zayas, J.F., 1997. Functionality of proteins in food. Berlin: Springer-verlag berlin Heidelberg.

proteins. Journal of Food Science, 7, 298-306.

Kristinsson, H.G., Theodore, A.E., Demir, N. and Ingadottir, B., 2005. A comparative study between acid- and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. Journal of Food Science, 70, C298-C306.

Nolsøe, H., Marmon, S.K. and Undeland, I., 2011. Application of filtration to recover solubilized proteins during pH- shift processing of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*); effects on protein yield and qualities of protein isolates. The Open Food Science Journal, 5, 1-9.

Palafox, H., Co´rdova-Murueta, J.H., Navarrete del Toro, M.A. and Garcı´a-Carren˜o, F.L., 2009. Protein isolates from jumbo squid *(Dosidicus gigas*) by pH-shift processing. Process Biochemistry, 44, 584-587.

Pires, C., Costa, S., Batista, A.P., Nunes, M.C., Raymundo, A. and Batista, I., 2012. Properties of protein powder prepared from Cape hake by-products. Journal of Food Engineering, 108, 268-275.

Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., Khamsorn, S., Chaijan, M. and Benjakul, S., 2009. Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. Journal of Food Chemistry, 112(1), 112-119.

Archive of SID

www.SID.ir

Composition and functional properties of isolated protein from Myctophid *(Benthosema pterotum*) using pH shift method

Oliyaei N.[1]; Moosavi-Nasab M.[2*]; Ghorbani M.[1]; Sadeghi Mahoonak A.R.[1]; Maghsoudloo Y. [1]

*marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca

1-Department of Food Science & Technology, Gorgan University, Iran
2-Seafood Processing Research Group, Department of Food Science and Technology, Shiraz University, Iran

Key words: Lantern fish *(Benthosema pterotum*), Fish protein isolate, Alkaline pH, Functional Properties.

Archive of SID

Abstract

This study investigated the composition and functional properties of isolated fish protein from Lanternfish *(Benthosema pterotum*). The proteins were isolated by using pH shift method. Basic pHs (10 and 12) were used to produce fish protein isolate. Fat contents of samples revealed that alkaline had a significant effect on reduction of fat in fish protein isolate. The lipid content decreased significantly by increasing the pH. Furthermore, the results showed that the functional properties including water holding capacity, oil holding capacity, emulsifying capacity, foaming and solubility were improved with increasing the pH and the fish protein produced at pH 12 had higher functional properties than the protein isolated at pH 10. Investigation and comparison of the color characteristics (L, a and b) attributed to the samples demonstrated that fish protein isolated at pH 12 was lighter (higher L) than that isolated at pH 10. In addition, redness (a) and yellowness (b) of protein isolates declined with increasing the pH. As a result, fish protein isolate from Lantrnfish produced using alkaline pH showed appropriate functional properties and alkaline led to improvement of the functionality and color characteristics of the protein isolate.

*Corresponding author

www.SID.ir