

(OPEN ACCESS)

Combined effects of Ultrasonication and pH Shift processes on recovery and techno-functional characteristics of protein isolate obtained from *Benthosema pterotum*

Mohsen Kazemi¹, Seyed Mahdi Ojagh^{*2}, Mehdi Abdollahi³, Alireza Alishahi⁴

1. Dept. of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: kazemi_mohsen@yahoo.com
2. Corresponding Author, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran and Associate Prof., Dept. of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: ojagh@ut.ac.ir
3. Dept. of Biology and Biological Engineering - Food and Nutrition Science, Chalmers University of Technology, SE 412 96 Gothenburg, Sweden. E-mail: abdollahi.mkh@gmail.com
4. Associate Prof., Dept. of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: alishahi@gau.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: The pH-shift process has emerged as a promising and effective technique for recovering and modifying muscle proteins from complex marine-based raw materials. Additionally, the ultrasonic technique is considered beneficial, particularly when recovery efficiency is reduced and as a modifier of techno-functional properties. This study aimed to investigate the combined effects of pH-shift and ultrasound-assisted extraction on the recovery yield and functional characteristics of protein isolates derived from lanternfish muscle.
Article history: Received: 05.24.2024 Revised: 05.25.2024 Accepted: 12.15.2024	
Keywords: Lanternfish, pH-shift process, Techno-functional properties, Ultrasonic	
	Materials and Methods: To determine the optimal pHs for solubilization and precipitation of proteins, solubility and whiteness index curves were initially plotted. Based on the curve results, two acidic pHs (2 and 2.5), two alkaline pHs (11.5 and 12), and a precipitation pH of 5.7 were selected. Protein extraction was then carried out at these pHs using both conventional and ultrasound-assisted methods. The techno-functional properties of the protein isolates were subsequently assessed, including solubility, emulsion activity index (EAI), emulsion stability index (ESI), foaming capacity (FC), and foam stability (FS).
	Results: Alkaline pHs showed higher protein solubility and recovery than acidic pHs, with the highest recovery obtained at pH 12. Ultrasound application improved protein solubility and recovery at both acidic and alkaline conditions. The highest overall protein recovery was observed under alkaline pH-shift conditions assisted by ultrasound at pH 11.5 (47.31%) and pH 12 (49.01%). Protein isolates obtained under alkaline conditions demonstrated superior solubility, emulsifying properties, and foaming characteristics compared to those obtained under acidic conditions. The positive effect of ultrasound was attributed to its ability to promote conformational changes induced by the pH-shift process. Overall, the combination of alkaline pH-shift and ultrasound-assisted extraction

proved to be an effective approach for producing relatively high-quality and cost-efficient protein isolates from lanternfish muscle suitable for gel- and emulsion-based food applications.

Cite this article: Kazemi, Mohsen, Ojagh, Seyed Mahdi, Abdollahi, Mehdi, Alishahi, Alireza. 2025. Combined effects of Ultrasonication and pH Shift processes on recovery and techno-functional characteristics of protein isolate obtained from *Benthoosema pterotum*. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (2), 235-259.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2024.22477.1877

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثر هم‌زمان فرایند تغییر pH و تکنیک التراسونیک بر بازدهی و چگونگی تغییر ویژگی‌های تکنو-فانکشنال پروتئین‌های جدا شده از عضله فانوس ماهی (*Benthoosema pterotum*)

محسن کاظمی^۱، سید مهدی اجاق^{۲*}، مهدی عبدالمهی^۳، علیرضا عالیشاهی^۴

۱. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: kazemi_mohsen@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران و دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: ojagh@ut.ac.ir
۳. گروه بیولوژی و مهندسی زیستی- تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه صنعتی چالمرز، سوئد. رایانامه: abdollahi.mkh@gmail.com
۴. دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: alishahi@gau.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: فرایند تغییر pH (pH-shift) به‌عنوان یک تکنیک نوآورانه و مؤثر برای بازیابی و اصلاح پروتئین‌های عضله از منابع دریایی پیچیده مطرح شده است. در کنار آن، استفاده از تکنیک التراسونیک نیز به‌ویژه در بهبود بازدهی و اصلاح ویژگی‌های عملکردی پروتئین، موردتوجه قرار گرفته است. هدف این مطالعه، بررسی اثر هم‌زمان این دو روش بر استخراج و اصلاح خواص عملکردی پروتئین‌های جدا شده از عضله فانوس ماهی بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۴	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۵	
واژه‌های کلیدی: التراسونیک، خواص تکنو-فانکشنال، فانوس ماهی، فرایند تغییر pH	مواد و روش‌ها: برای تعیین مناسب‌ترین pH جهت انحلال و ترسیب پروتئین‌ها، ابتدا منحنی‌های درصد حلالیت و شاخص سفیدی رسم شد. بر اساس نتایج، pHهای ۲ و ۲/۵ (اسیدی) و ۱۱/۵ و ۱۲ (قلیایی) برای انحلال و pH ۵/۷ برای ترسیب انتخاب گردیدند. فرایند استخراج پروتئین‌ها در این pHها به دو صورت کلاسیک و با کمک امواج التراسونیک انجام گرفت. سپس ویژگی‌های تکنوفانکشنال ایزوله‌های پروتئینی شامل حلالیت، ظرفیت و پایداری امولسیون، و کف‌کنندگی و پایداری کف، ارزیابی شدند.
	یافته‌ها: pHهای قلیایی نسبت به اسیدی بازدهی و درصد پروتئین حل شده بیش‌تری نشان دادند و بیش‌ترین بازدهی در pH ۱۲ مشاهده شد. استفاده از التراسونیک باعث افزایش درصد انحلال و بازدهی در هر دو محدوده pH اسیدی و قلیایی گردید. بالاترین بازدهی کل پروتئین (به‌ترتیب

۴۷/۳۱ درصد و ۴۹/۰۱ درصد) در pH های قلیایی ۱۱/۵ و ۱۲ با کمک امواج التراسونیک حاصل شد. در مقایسه بین ایزوله‌های پروتئینی اسیدی و قلیایی، نمونه‌های قلیایی ویژگی‌های عملکردی بهتری شامل حلالیت، توان امولسیون‌سازی و کف‌کنندگی داشتند. اثر مثبت التراسونیک به توان آن در پرموت کردن تغییرات کنفورماسیونی ناشی از فرآیند تغییر pH نسبت داده شد. به‌طور کلی، با توجه به خصوصیات زیستی ویژه فانوس ماهی، استفاده ترکیبی از فرآیند تغییر pH قلیایی و التراسونیک می‌تواند راهکاری مؤثر برای تولید ایزوله‌های پروتئینی با کیفیت مناسب و هزینه کم جهت کاربرد در سیستم‌های غذایی ژلی و امولسیونی باشد.

استناد: کاظمی، محسن، اجاق، سید مهدی، عبدالحی، مهدی، عالیشاهی، علیرضا (۱۴۰۴). اثر هم‌زمان فرایند تغییر pH و تکنیک التراسونیک بر بازدهی و چگونگی تغییر ویژگی‌های تکنو-فانکشنال پروتئین‌های جدا شده از عضله فانوس ماهی (*Benthosema pterotum*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۲)، ۲۳۵-۲۵۹.

Doi: 10.22069/japu.2024.22477.1877



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

ماهی منبع مهم پروتئین برای بسیاری از مردم در سراسر جهان است و حدود ۲۰ درصد از مصرف پروتئین حیوانی جهانی و تقریباً ۷ درصد از کل پروتئین مصرفی انسان را تشکیل می‌دهد اما صید بیش از حد ذخایر ماهیان تجاری هم‌چنان یک مشکل رو به رشد و نیازمند ارائه راه‌حل‌های مؤثر است. طبق گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO)، تقریباً ۹۰ درصد از ذخایر ماهیان تجاری در سطح جهانی بیش از حد صید شده‌اند و این بدان معناست که این ذخایر بسیار سریع‌تر از قابلیت بازسازی صید می‌شوند. این امر بر اکوسیستم دریایی و جوامع ساحلی که به ماهیگیری وابسته هستند تأثیر منفی می‌گذارد (۱ و ۲). یکی از گزینه‌های پیشنهاد شده برای کاهش فشار بر ذخایر ماهیان تجاری؛ بهره‌برداری از منابع تاکنون بهره‌برداری نشده (اصطلاحاً منابع غیرتجاری)، ترجیحاً از سطوح تغذیه‌ای پایین‌تر، مانند موجودات ناحیه مزوپلاژیک است (۱). ماهیان غیرتجاری منظور زیست‌توده‌ای است که اغلب به شکل صید‌ضمنی و یا با اهدافی غیر از مصارف انسانی صید می‌شوند. این محصولات طی فرآیند صید ضمنی به دلایلی مانند کمبود یا فقدان ارزش تجاری، هزینه و دشواری‌های مرتبط با مراحل سورتینگ و نگهداری و هزینه بالای فرآوری نسبت به ارزش آن‌ها دور ریخته می‌شوند. ناحیه مزوپلاژیک که از عمق ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ متر کشیده شده؛ حدود ۶۰ درصد از سطح سیاره و ۲۰ درصد از حجم کل اقیانوس‌ها را تشکیل داده؛ و بخش بزرگی از کل بیوسفر موجود را شامل می‌شود. مقدار کل زیست‌توده ماهی موجود در ناحیه مزوپلاژیک در حدود ۱۰۰۰۰ میلیون تن در سطح جهانی تخمین‌زده می‌شود که معادل ۱۰۰ برابر میزان صید سالانه صید تجاری است (۱ و ۲). فانوس ماهیان فون غالب (تشکیل‌دهنده بالغ بر ۷۰ درصد) از ماهیان ناحیه

مزوپلاژیک در جهان هستند. اکثر فانوس ماهیان به دلیل وجود مقادیر بالای استر واکس در چربی بدن به عنوان غذای انسان قابل استفاده نیستند. درواقع کم‌تر از ۱۰ گونه از ۴۰۵ گونه میکتوفید خوراکی هستند. میکتوفیدها از نظر تغذیه و اقتصادی به واسطه تامین مواد اولیه برای صنایع پودر ماهی و هم‌چنین مصارف انسانی دارای اهمیت جهانی هستند (۳). *B. pterotum* که به نام کلی فانوس ماهی نیز شناخته می‌شود، یک نمونه از گونه‌های خوراکی با منشأ مزوپلاژیک و بزرگ‌ترین ذخیره میکتوفیده در دریای عمان (بر طبق آمار فائو در سال ۲۰۰۷) و دریای چین شرقی است. این ماهی به عنوان زیست‌توده غنی از مواد مغذی (منبع خوبی از پروتئین‌ها، چربی‌ها و مواد معدنی) به طور سنتی به عنوان صید جانبی تلقی شده و اغلب برای تولید پودر ماهی و روغن کم‌ارزش در خوراک دام استفاده می‌شود (۳، ۴، ۵). با این وجود، فانوس ماهیان به عنوان یک ماده خام اولیه ارزان، در دسترس و با کیفیت تغذیه‌ای مناسب می‌توانند علاوه بر پودر ماهی، از طریق اعمال روش‌های مناسب آماده‌سازی و فرآوری، در تغذیه انسانی نیز مورد استفاده قرار گیرند (۶). از موانع موجود در استفاده از گونه *B. pterotum* به عنوان غذای انسان به طور ویژه به مشکلاتی مانند اندازه خیلی کوچک، فسادپذیری بالا، رنگ تیره عضله و محتوای واکس‌های استری اشاره شده است (۶). بر طبق بررسی مقدماتی و تجربیات نویسندگان *B. pterotum* یک ماهی کوچک (حداکثر اندازه ۴ تا ۵ سانتی‌متر) با ویژگی‌های پیچیده و عجیب است. این ماهی بسیار فسادپذیر، رنگ ذاتی گوشت آن نسبتاً نارنجی تیره و به دلیل بافت نرم؛ سر و دم زنی و تخلیه شکمی آن بسیار دشوار است. در طول فرآیند چرخ کردن ماهی کامل نیز تحت تأثیر محتوای بالای رنگدانه‌های ملانین در اندام‌ها؛ مینس آن کاملاً تیره

می‌شود که سبب می‌شود جداسازی پروتئین‌ها از طریق رویکردهای مرسوم نظیر تولید سوریمی بغرنج باشد (۷).

انحلال قلیایی و یا اسیدی پروتئین‌ها و در ادامه ترسیب در ناحیه ایزوالکتریک باهدف جداسازی انتخابی پروتئین‌ها از مواد خام؛ فرآیندی اصطلاحاً موسوم به پروسه pH-shift (تغییر pH)؛ به‌عنوان یک تکنیک نویددهنده و امیدبخش درجهت بازیابی پروتئین‌های عضله از موادخام دریایی پیچیده، مانند ماهیان تیره‌گوشت چرب کامل و تخلیه‌شکمی شده، محصولات برجای مانده از خط تولید آبزیان، صدف‌های آبی و کریل شناخته شده‌است (۸). این تکنیک از زمان اختراع آن به‌طور موفقیت‌آمیز برای استخراج پروتئین از مواد خام خاص و پیچیده‌ای از جمله ماهی‌های کوچک سطح‌زی چرب کامل و تخلیه‌شکمی شده (۹، ۱۰، ۱۱)، فرآورده‌های جانبی برجای مانده از خط فرآوری انواع ماهیان (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵)، تخم ماهی (۱۶، ۱۷)، فرآورده‌های جانبی سخت‌پوستان (۱۸)، ماکرو جلبک‌های دریایی (۱۹) و برخی از ارگانسیم‌های خشکی مانند سفیره کرم ابریشم (۲۰)، محصولات جنبی برجای مانده از فرآوری مرغ (۲۱) و دانه‌های گیاه جینگو (۲۲) مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این روش تغییر pH به‌نوبه خود به‌طور مؤثر برای اصلاح خواص عملکردی پروتئین‌هایی مانند پروتئین ایزوله برنج (۲۳)، پروتئین دانه جینگو (۲۲)، پروتئین ایزوله شده از گوشت سینه مرغ (۲۴) و پروتئین ایزوله شده از سفیره کرم ابریشم (۲۰) استفاده شده است. در طی این فرآیند، پروتئین‌ها تحت باز شدن جزئی ناشی از pH های بسیار بالا یا پایین قرار می‌گیرند و سپس هنگام تنظیم pH به خنثی یا نقطه ایزوالکتریک، دوباره تا می‌شوند. این تا شدن مجدد ساختار و شکل اصلی اولیه را بازیابی نمی‌کند و حالتی به نام "مولتن گلوبول" را تشکیل می‌دهد که

ساختار و کارکرد پروتئین‌ها را متفاوت می‌کند (۲۰). با وجود استفاده گسترده از پروتکل‌های سنتی و مرسوم استخراج در سطح صنعتی، گرایش فزاینده‌ای برای استفاده از فناوری‌های نوآورانه برای بهبود کارایی استخراج ترکیبات زیستی وجود دارد. هدف اصلی از به‌کارگیری تکنیک‌های جدید، بهبود کارایی فرآیند نسبت به روش‌های مرسوم از طریق افزایش بازده استخراج و هم‌زمان کاهش زمان و انرژی مصرفی فرآیند است. نویددهنده‌ترین تکنیک‌های نو ظهور مطرح شده در منابع مختلف؛ استفاده از امواج مایکروویو، فراصوت، فشار بالا، آنزیم‌ها و فرآیندهایی مثل استفاده از اکستروژن واکنشی و فوتوبلیچینگ می‌باشند (۲۵). تکنیک التراسونیک به‌خصوص در مواردی که بازدهی به خطر می‌افتد می‌تواند مفید باشد. کارایی استخراج با کمک امواج اولتراسونیک به‌عنوان یک روش جایگزین برای بازیابی ترکیبات زیستی به‌طور گسترده مورد ارزیابی قرار گرفته است. این روش از اثر کاویتاسیون (جوشش سیال در اثر افت فشار نه افزایش دما) ناشی از تشکیل حفره‌های صوتی در حلال و فروپاشی میکرو حباب‌های نامتقارن استفاده می‌کند. این پدیده مقدار زیادی انرژی آزاد کرده و سبب تولید ریز جت‌ها، امواج ضربه‌ای و نیروی برشی بالا می‌شود. نیروهای هیدرودینامیکی ایجادشده با تأثیر مثبت بر روند فروپاشی دیواره سلول، انتقال جرم بین فازهای غیرقابل اختلاط، افزایش نفوذ حلال و بهبود اثرات موینگی و هم‌چنین کاهش اندازه ذرات کارایی فرآیند و بازدهی استخراج را افزایش می‌دهند (۱۸، ۲۶، ۲۷). تکنیک التراسونیک هم‌چنین پتانسیل استفاده به‌عنوان یک عامل بهبوددهنده ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها را داراست. این امواج با ایجاد تغییراتی در ساختار پروتئین؛ از طریق شکستن پیوندهای مولکولی غیرکووالانسی (نسبت به پیوندهای کووالانسی و بنابراین ساختار اول پروتئین

به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت. هم‌چنین طبق نتایج امواج التراسونیک سبب تبدیل ساختار مارپیچ آلفا به صفحات بتا شد. در مجموع بر طبق نتیجه‌گیری پژوهش‌گران؛ اعمال امواج التراسونیک فقط در مرحله بازشدن پروتئین‌ها دارای تأثیر مثبت بود (۲۸).

بنابراین در این مطالعه از اثر هم‌زمان این دو تکنیک برای افزایش بازدهی استخراج و اصلاح خواص عملکردی پروتئین‌های جدا شده از عضله فانوس ماهی استفاده شد. در ابتدا به‌منظور کشف pH‌های بهتر برای انحلال و ترسیب پروتئین‌ها؛ منحنی‌های درصد حلالیت و شاخص سفیدی آن‌ها ترسیم شدند. در ادامه پس از استخراج پروتئین‌های عضله در شرایط بهینه تعیین شده؛ ویژگی‌های تکنوفانشکال ایزوله‌های پروتئین به‌عنوان تابعی از pH از منظر درصد حلالیت، شاخص‌های ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون و شاخص‌های درصد کف‌کنندگی و پایداری کف مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی نمونه ماهی و سایر مواد مورد نیاز پژوهش: طی دو روز پس از صید، بلوک‌های منجمد (هر کدام حدود ۱۲ کیلوگرم) فانوس ماهیان (*B. pterotum*) از کشتی صید ترال کویان در ساحل بندرعباس تهیه شدند. این بلوک‌ها (به‌صورت پوشیده شده با یخ خشک) با هواپیما به آزمایشگاه فرآوری آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شده و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. دیگر مواد شیمیایی استفاده‌شده در این پژوهش از گرید آزمایشی و دارای خلوص مناسب بودند.

بی‌اثر است) مانند پیوندهای هیدروژنی و نیروهای الکترواستاتیکی که سبب تغییر ساختار ثانویه و هم‌چنین دنا توره شدن جزئی ساختارهای سوم و چهارم می‌شوند؛ منجر به در معرض قرارگرفتن برخی از گروه‌های عاملی مانند گروه‌های آبگریز و سولفیدریل شده و در نتیجه بر ویژگی‌های فانکشنال پروتئین‌ها معمولاً اثر مثبت دارند (۲۸، ۲۹، ۳۰). استفاده از امواج التراسونیک هم‌چنین می‌تواند محدودیت‌های روش تغییر pH به‌منظور کاربرد در فرآیندهای استخراج پروتئین با مقیاس بالا (صنعتی / نیمه صنعتی) را کاهش دهد (به‌عنوان مثال کمک به استفاده کم‌تر از حلال‌ها و/یا مواد شیمیایی مورد استفاده) (۳۱). در این رابطه اثر سینرژیستیک روش تغییر pH (نسخه قلیایی) و تکنیک التراسونیک، بازدهی استخراج را به حداکثر رسانده و ویژگی‌های عملکردی (ظرفیت‌های امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی) و کیفیت تغذیه‌ای (ترکیب اسیدآمینه و قابلیت هضم پروتئین) را به ترتیب در پروتئین‌های استخراج شده از محصولات جنبی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۲) و لایستر (۱۸) بهبود بخشید. این اثرات سینرژیستیک مثبت در ارتقا ویژگی‌های ساختاری و عملکردی پروتئین حاصل از شیر نارگیل نیز اثبات شده است (۲۹). امواج اولتراسوند با شدت بالا در هر دو مرحله بازشدن و تاشدن پروتئین‌ها در فرایند تغییر pH برای بهبود خواص عملکردی پروتئین ناحیه سینه مرغ به‌کار گرفته شدند. نتایج نشان‌داد نمونه‌های تیمار شده با تکنیک التراسونیک در مرحله بازشدن پروتئین‌ها؛ حلالیت، ظرفیت امولسیون‌کنندگی و رئولوژی بالاتری داشتند. نتایج حاصل از بررسی پتانسیل زتا و اندازه ذرات نشان دادند امواج التراسونیک به‌طور قابل‌توجهی ساختار پروتئین را تغییر دادند. طیف‌سنجی فلورسانس نشان داد آبگریزی پروتئین‌ها تحت تأثیر امواج التراسونیک

پایه‌سازی روش تغییر pH کلاسیک و کمک‌شده با امواج التراسونیک با هدف استخراج پروتئین‌ها: نمونه‌های ماهی پس از ورود به آزمایشگاه؛ ابتدا زیر آب جاری انجمادزدایی و شسته‌شده و سپس با استفاده از یک چرخ گوشت رومیزی چرخ شدند. قبل از اعمال فرآیند اصلی استخراج؛ ارزیابی‌های مقدماتی برای یافتن بهینه‌ترین pHها برای انحلال و رسوب پروتئین‌ها طبق روش قبلاً توضیح داده شده توسط آندلند و همکاران (۲۰۰۳) صورت پذیرفت. بدین‌صورت که ابتدا گوشت چرخ‌شده ماهی با آب مقطر سرد (به نسبت ۱ به ۶) به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه همگن شد (IKA T25 Digital ULTRA-TURRAX Disperser).

محلول حاصل به بخش‌های مورد نیاز تقسیم شده و pH آن‌ها با استفاده از HCl و NaOH (۰/۲ و ۲ نرمال) در حدواصل بین ۱/۵ تا ۱۲/۵ تنظیم شد. پس از نگهداری به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ نمونه‌ها در سانتریفیوژ از پیش‌سردشده (۴ درجه سانتی‌گراد) (Eppendorf 5810R Refrigerated Centrifuge) به مدت ۲۰ دقیقه با نیروی گریز از مرکز ۸۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سپس محلول‌های موجود در لایه میانی جمع‌آوری شده و مقدار پروتئین آن‌ها با تست بیورت سنجیده شد. از پروتئین آلبومین سرم گاوی برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. درصد حلالیت پروتئین طبق معادله (رابطه ۱) زیر محاسبه شد:

$$\text{Protein solubility (\%)} = \frac{\text{Initial protein content (mg/ml)}}{\text{Middle-layer protein content (mg/ml)}} \times 100 \quad (1)$$

در مرحله بعد، براساس منحنی حلالیت pH نمونه‌ها در ۵/۷ تنظیم شدند و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (با هدف تکمیل فرآیند رسوب)، با نیروی گریز از مرکز ۸۵۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد تا پروتئین‌های رسوب کرده آبگیری شوند. به همین ترتیب شاخص سفیدی پروتئین‌های به‌دست‌آمده تعیین شد.

در گام بعد مراحل اصلی استخراج شامل روش‌های کلاسیک تغییر pH و حالت کمک‌شده با امواج التراسونیک بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی‌های مقدماتی انجام شدند. در روش کلاسیک، ۳۴۰ گرم گوشت چرخ‌شده ماهی با ۶ برابر حجم آب مقطر سرد همگن شده و pH نمونه‌ها در حالت اسیدی (۲ و ۲/۵) یا قلیایی (۱۱/۵ و ۱۲) تنظیم شد. ادامه فرآیند تا مرحله ریکاوری پروتئین‌های رسوب داده‌شده مطابق با دستورالعمل‌های فوق‌الذکر انجام

گرفت. در حالت کمک‌شده با امواج التراسونیک؛ پس از دیسپرس کردن نمونه‌ها و تنظیم pH؛ همگن‌سازی به مدت ۱۰ دقیقه با امواج فراصوت (۲۰ کیلوهرتز، ۲۵۰ وات) با حالت پالس ثابت ۵ ثانیه روشن و ۵ ثانیه خاموش تحت تیمار قرار گرفتند. باهدف پیشگیری از گرم شدن موضعی که می‌تواند بر ساختار پروتئین تأثیر منفی بگذارد از حمام یخ طی همگن‌سازی التراتوراکس و التراسونیک استفاده شد. پس از طی مراحل بعدی مثل حالت سکون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ و جداسازی لایه میانی؛ پروتئین‌ها با تنظیم pH در ۵/۷ و سانتریفیوژ متعاقب همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد بازیابی و استحصال شدند. pH پروتئین‌های استخراج‌شده با استفاده از محلول NaOH سرد (۲ نرمال) در ۷ تنظیم شده و پس از افزودن محافظ‌های سرمایی (۴ درصد (وزنی/وزنی) ساکارز و ۴ درصد (وزنی/وزنی) سوربیتول طبق رطوبت ۸۰ درصد در پروتئین‌ها) تا

پروتئین سوپرناتانت با استفاده از روش بیورت تعیین شد و درصد حلالیت در آب پروتئین‌ها مطابق معادله زیر محاسبه شد.

$$\text{Protein water solubility (\%)} = \frac{C_s}{C_{max}} \times 100 \quad (۶)$$

در این رابطه، C_x نشان‌دهنده غلظت پروتئین در محلول پروتئین با قابلیت انحلال‌پذیری حداکثر قبل از سانتریفیوژ (C_{max}) و در سوپرناتانت‌ها پس از سانتریفیوژ (C_s) است.

ویژگی‌های تشکیل کف: برای ارزیابی دو ویژگی ظرفیت کف‌کنندگی (FC) و پایداری کف (FS) پروتئین‌ها؛ از پروتکل تا حدی اصلاح‌شده شهیدی و همکاران (۱۹۹۵) استفاده شد. ۰/۲۵ گرم از نمونه پروتئین (براساس وزن خشک) به‌طور کامل در آب مقطر (تا رسیدن به حجم کل ۲۵ میلی‌لیتر) دیسپرس شده و pH آن در ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ تنظیم شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از یک هموژنایزر Ultra-Turrax (۱۰۰۰۰ rpm) به مدت ۲ دقیقه همگن شدند. معادلات زیر برای محاسبه مقادیر FC و FS استفاده شدند (۳۳).

$$FC (\%) = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100 \quad (۷)$$

$$FS (\%) = \frac{V_{60} - V_0}{V_0} \times 100 \quad (۸)$$

در این رابطه، V_x نشان‌دهنده حجم‌های کل اولیه (V_0)، پس از همگن‌سازی (V_1) و پس از باقی‌ماندن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه است (V_{60}).

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: دو ویژگی شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) و پایداری امولسیون (ESI) با پیروی از پروتکلی که توسط اوگونولو و همکاران (۲۰۰۹) شرح داده شده است با اندکی اصلاح ارزیابی شد. ۰/۳ گرم نمونه پروتئین (براساس

زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی توزیع وزنی و بازده کل پروتئین: برای ردیابی و کشف نحوه توزیع پروتئین‌ها در طول فرآیند استخراج؛ پارامترهایی مانند درصد پروتئین حل‌شده (SP)، درصد پروتئین رسوب داده‌شده (PP)، درصد پروتئین بازیابی‌شده (RP) و هم‌چنین درصد بازده کلی پروتئین (TY) با استفاده از معادلات زیر طبق روش عبدالهی و همکاران محاسبه شدند (۳۲). محتوای پروتئین (PC) در محلول‌های همگن‌شده در pH موردنظر (H)، سوپرناتانت مرحله اول (S1) و سوپرناتانت مرحله دوم (S2) با استفاده از روش‌های کج‌دال و بیورت تعیین شدند. وزن‌های (W) گوشت چرخ‌شده (M) و ایزوله‌های پروتئینی استخراج‌شده (RPI) در سطح رطوبت برابر اندازه‌گیری شدند.

$$SP(\%) = \frac{PC \text{ of } S1 (mg)}{PC \text{ of } H (mg)} \times 100 \quad (۲)$$

$$PP(\%) = \frac{PC \text{ of } S1 (mg) - PC \text{ of } S2 (mg)}{PC \text{ of } S1 (mg)} \times 100 \quad (۳)$$

$$RP(\%) = \frac{PC \text{ of } S1 (mg) - PC \text{ of } S2 (mg)}{PC \text{ of } H (mg)} \times 100 \quad (۴)$$

$$TY(\%) = \frac{W \text{ of } RPI (g)}{W \text{ of } M (g)} \times 100 \quad (۵)$$

سنجش ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها

درصد حلالیت در آب: برای اندازه‌گیری قابلیت حلالیت در آب پروتئین‌ها؛ ابتدا ۱ گرم از هر نمونه پروتئین (براساس وزن خشک) در آب مقطر (تا رسیدن به حجم نهایی ۴۰ میلی‌لیتر) کاملاً همگن شد. pH محلول در محدوده بین ۲ تا ۱۲ (با استفاده از محلول‌های HCl یا NaOH یک نرمال) تنظیم شد و سپس با سرعت ۱۵۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محتوای

وزن خشک) به طور کامل در آب مقطر (حجم کل ۳۰ میلی‌لیتر) همگن شده و pH آن به ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ تنظیم شد. روغن گیاهی آفتابگردان (۱۰ میلی‌لیتر) به محلول‌ها اضافه شد و مخلوط‌ها به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰ rpm همگن شدند تا یک سیستم امولسیون ایجاد شود. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر امولسیون از ته ظرف (بلافاصله و بعد از ۱۰ دقیقه) برداشته شد؛ با ۵ میلی‌لیتر محلول SDS ۱ درصد مخلوط شد؛ و عدد جذب آن در ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. دو ویژگی EAI و ESI از طریق رابطه‌های زیر محاسبه شدند.

$$EAI (m^2/g) = \frac{2 \times 2.303 \times Abs_0 \times DF}{C \times \varphi \times \theta \times 10000} \quad (9)$$

$$ESI (min) = \frac{Abs_{10} \times \Delta t}{\Delta Abs} \times 100 \quad (10)$$

در اینجا، Abs_x نشان‌دهنده مقدار جذب ثبت‌شده بلافاصله (Abs_0) و پس از ۱۰ دقیقه (Abs_{10}) در طول موج ۵۰۰ نانومتر، DF ضریب رقیق‌سازی اعمال‌شده هنگام اندازه‌گیری Abs_0 ، C بیانگر غلظت اولیه پروتئین (گرم بر میلی‌لیتر)، φ نماینده کسر حجمی روغن (۰/۲۵)، θ نشان‌دهنده عرض کووت (۱ سانتی‌متر)، Δt نشان‌دهنده زمان سپری‌شده (۱۰ دقیقه) و ΔAbs برابر با $Abs_0 - Abs_{10}$ می‌باشند.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) انجام شد. داده‌ها ابتدا با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین نمونه‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

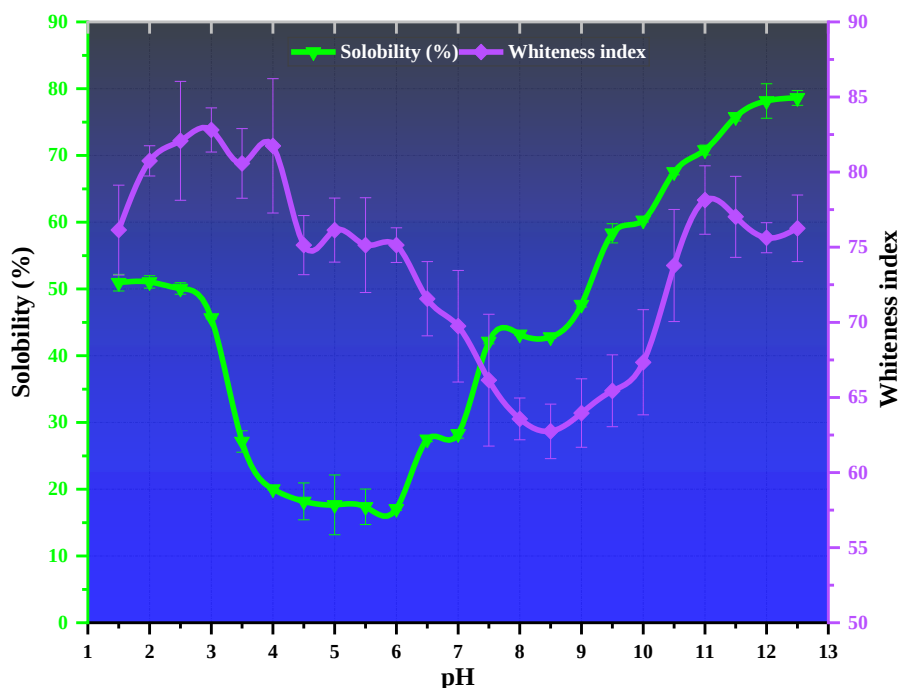
نتایج و بحث

منحنی‌های حلالیت و شاخص سفیدی: نتایج مربوط به ارزیابی مقدماتی درصد حلالیت و شاخص سفیدی پروتئین‌ها به‌عنوان تابعی از pH های مختلف در شکل

۱ نشان داده شده است. طی فرآیند تغییر pH عوامل متعدد (مانند وجود آنزیم‌های فراوان به‌ویژه هنگام استفاده از ماهی کامل) به موازات pH های لحاظ شده ممکن است بر حلالیت پروتئین‌ها اثرگذار باشند که این مسأله پیش‌بینی بهترین pH ها برای انحلال و ترسیب را دشوار و بنابراین ترسیم منحنی درصد حلالیت را الزام‌آور می‌کند. همان‌طورکه مشخص است بیش‌ترین درصد حلالیت پروتئین در pH های بسیار پایین (اسیدی) و یا بالا (قلیایی) مشاهده شد. در ناحیه اسیدی بالاترین مقدار حلالیت در pH ۲ مشاهده شد (۵۱/۰۵ درصد) و با حرکت به سمت pH های بالاتر روند کاهش تا ۲/۵ (۵۰/۰۸ درصد) ناچیز اما پس از آن این روند تشدید شد. کم‌ترین مقدار حلالیت در pH های ۵/۵ تا ۶ ملاحظه شد بنابراین حدوسط آن‌ها یعنی pH ۵/۷ به‌عنوان نقطه انتخابی برای ترسیب پروتئین‌ها در مرحله بعدی استفاده شد. با افزایش pH به سمت ناحیه قلیایی حلالیت به‌طور متناوب افزایش یافت به‌نحوی‌که بیشینه میزان حلالیت در pH ۱۲ و ۱۲/۵ (به‌ترتیب ۷۸/۱۶ و ۷۸/۶۲ درصد) مشاهده شدند. افزایش حلالیت در pH های پایین و بالا به‌ترتیب مربوط به افزایش بارهای مثبت و منفی پروتئین‌های عضله است که سبب ایجاد دافعه الکترواستاتیک بین مولکول‌های پروتئین؛ واکنش بهتر آن‌ها با آب و متعاقباً سبب افزایش مقدار حلالیت می‌شود (۳۴). در pH ایزوالکتریک در اثر برابر شدن بارهای روی پروتئین‌ها و فقدان دافعه الکترواستاتیک بین آمینواسیدهای باردار؛ پروتئین‌ها در تماس نزدیک‌تر با یکدیگر قرار می‌گیرند. این پروسه برهمکنش‌های هیدروفوب و نتیجتاً تجمع و کاهش حلالیت پروتئین‌ها را پرموت می‌کند (۳۵). این روند تغییرات حلالیت با مشاهدات حاصل ارزیابی ماهیان کاد و هرینگ (۱۴)، ضایعات ماهی هرینگ (۱۵)، گربه‌ماهی کانال (۳۴) و تیلاپیا (۳۵) مطابقت داشت.

شد این رنگدانه‌ها در پروتئین‌های استخراج شده در pHهای قلیایی مجموعاً بالاتر از انواع اسیدی بودند که همین امر می‌تواند عامل بالاتر بودن شاخص سفیدی در پروتئین‌های pH اسیدی استخراج شده باشد. در pHهای میانی محتوای رنگدانه‌ها سنجیده نشد اما یک دلیل احتمالی برای روند نزولی شاخص سفیدی در این ناحیه می‌تواند ارتباط آن با بازدهی باشد. به این صورت که احتمالاً در این pHها با کاهش میزان بازدهی نسبت ملانین به پروتئین‌ها افزایش پیدا کرده که متعاقباً سبب کاهش شاخص سفیدی در پروتئین‌ها شده است. این پدیده (رابطه مثبت درصد حلالیت و شاخص سفیدی) هرچند نه در همه طیف مورد بررسی اما در خیلی از نقاط و به‌ویژه ناحیه قلیایی قابل مشاهده است. در مجموع با توجه به نتایج حاصل شده در این بخش؛ pH ۲ اسیدی (۲ و ۲/۵) و pH ۱۱/۵ و ۱۲ برای انحلال پروتئین‌ها انتخاب شدند. ترسیب پروتئین‌ها نیز همان‌طور که ذکر شده در pH ۵/۷ صورت گرفت.

طبق آنالیز گراف متعلق به شاخص سفیدی پروتئین‌های استخراج شده در pHهای گوناگون؛ پروتئین‌های ناحیه اسیدی در مجموع شرایط بهتری داشتند. در این رابطه بالاترین مقدار شاخص سفیدی در pH ۳ (۸۲/۸۰) مشاهده شد. با حرکت به سمت نواحی میانی طیف به تدریج شاخص سفیدی کاهش یافت. این روندکاهشی با ادامه افزایش pH به سمت نواحی قلیایی همچنان ادامه یافت و به مینیمم حالت خود در pH ۸/۵ (۶۲/۷۴) رسید. پس از این نقطه با افزایش pH این شاخص بهبود یافت و به مقدار ۷۸/۱۴ در pH ۱۱ رسید. پس از این نقطه و با افزایش pH؛ شاخص سفیدی مجدداً روند نزولی پیدا کرد. دلیل این اختلافات را می‌توان به عواملی مثل اختلاف در نوع رنگدانه‌های موجود و محتوای آن‌ها، شرایط شیمیایی رنگدانه (مثلاً اکسیداسیون رنگدانه‌های هم)، خواص فانکشنال مثل ظرفیت نگهداری آب نسبت داد. به‌عنوان مثال در بخش آنالیز محتوای رنگدانه‌های هم و ملانین (داده‌ها نمایش داده نشده است) ملاحظه



شکل ۱- منحنی‌های درصد حلالیت و شاخص سفیدی پروتئین‌های عضله به‌عنوان تابعی از pHهای مختلف.

Figure 1. Percentage solubility curves and whiteness index of muscle proteins as a function of different pH.

آنالیز توزیع وزنی و درصد بازدهی: چگونگی توزیع وزنی پروتئین‌ها طی فرآیند استخراج و هم‌چنین درصد بازدهی کل در شکل a ۲ به تصویر کشیده شده است. هم‌چنین ماتریکس همبستگی پیرسون بین ویژگی‌های سنجیده شده در شکل b ۲ قابل مشاهده است. پیش از این اشاره شد سنجش پارامترهایی مانند درصد پروتئین حل شده (SP)، درصد پروتئین رسوب داده‌شده (PP)، درصد پروتئین بازیابی‌شده (RP) برای ردیابی و کشف نحوه توزیع پروتئین‌ها در طول فرآیند استخراج ضروری است. هم‌چنین درصد بازدهی کل پروتئین (TY) کارآمدی تکنیک استفاده شده برای استخراج را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود؛ درصد پروتئین حل شده در نمونه‌های تحت تیمار قلیا بسیار بیش‌تر از همتایان اسیدی آن‌ها بود ($P < 0.05$) به‌طوری‌که صرف‌نظر از موارد استفاده از امواج التراسونیک؛ بیش‌ترین درصد پروتئین حل شده در pH ۱۱/۵ و سپس ۱۲ مشاهده شد. با اعمال تکنیک التراسونیک؛ درصد پروتئین‌های حل‌شده در تمامی تیمارها افزایش معنی‌دار نشان داد. این نتایج حکایت از اثر مثبت امواج التراسونیک در آزادسازی پروتئین‌های زیست‌توده تحت تیمار و انتشار آن‌ها به درون محلول استخراج داشت. گزارش شده است که مقدار حلالیت فاکتور عمده مؤثر بر بازدهی نهایی استخراج در فرآیند تغییر pH است. طبق مشاهدات این پارامتر به نوعی تعیین‌کننده چگونگی سایر ویژگی‌ها بود به‌طوری‌که نمونه تیمار شده با pH ۱۲ و التراسونیک با بیش‌ترین مقدار از پروتئین حل شده ($89/07$ درصد)؛ درصد بالایی از پروتئین رسوب داده شده ($80/40$ درصد)، پروتئین بازیابی‌شده ($72/68$ درصد)، و بازده کلی پروتئین ($49/01$ درصد) را ارائه کرد. همین سلسله‌مراتب در سایر تیمارها نیز دیده شد به‌طوری‌که درصد پروتئین حل شده بیش‌تر؛ منتج به درصد‌های بیش‌تری از پروتئین رسوب‌داده شده، پروتئین بازیابی شده و بازدهی کلی شد. این پدیده در ماتریکس همبستگی پیرسون متغیرها که در شکل 2b

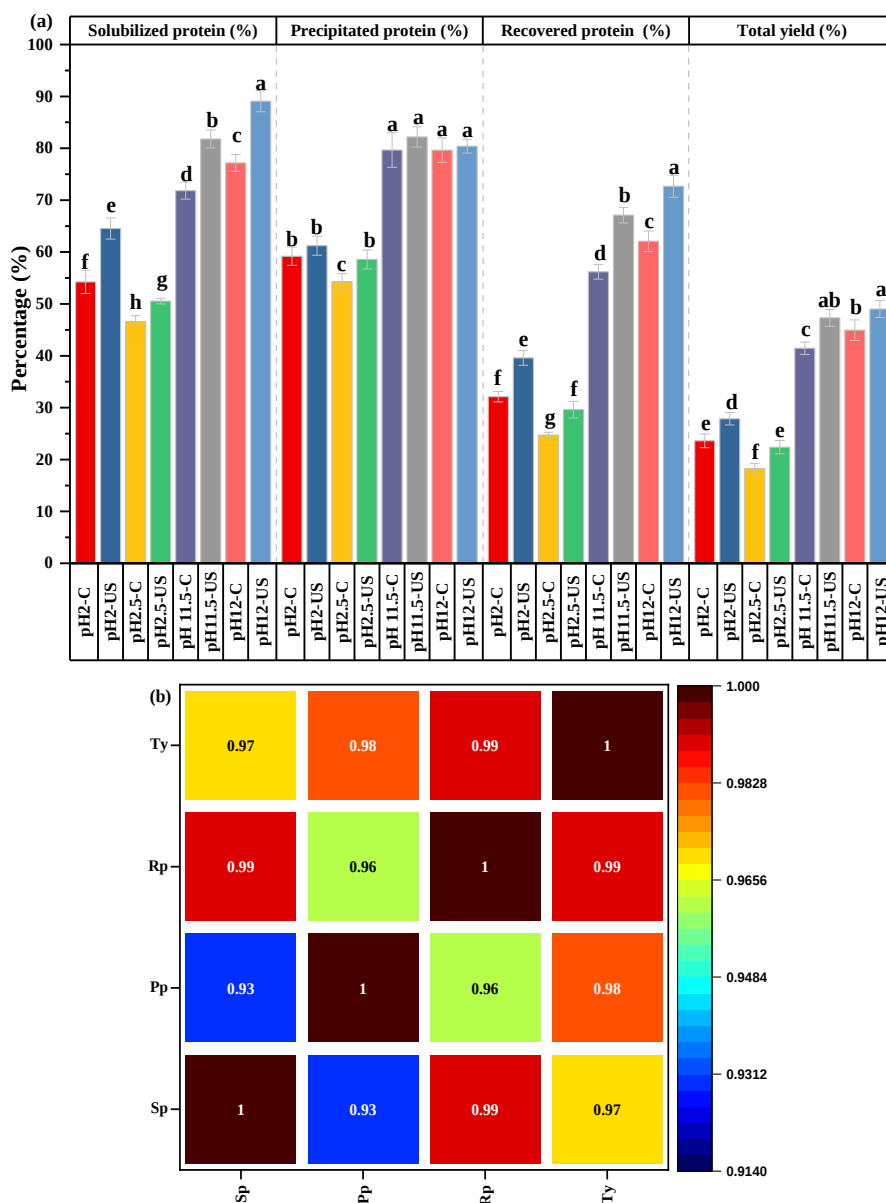
نمایش داده شده است نیز کاملاً مشهود است. همان‌طورکه ملاحظه می‌شود تمامی متغیرها همبستگی بالایی ۰/۹ نشان دادند. نکته جالب توجه در این نتایج؛ همبستگی بالایی درصد پروتئین رسوب داده شده با درصد پروتئین حل شده بود به‌طوری‌که طبق نتایج ظاهراً افزایش محتوای پروتئین در محلول بر ترسیب آن‌ها اثر مثبت داشته است.

توانمندی بیش‌تر pH‌های قلیایی نسبت به اسیدی در انحلال پروتئین‌ها در پژوهش‌های مشابه گزارش شده است (۱۲، ۱۵، ۳۲). بیشینه انحلال‌پذیری پروتئین و بازدهی فرآیند ایزولاسیون پروتئین از ضایعات ماهی سالمون، کاد و هرینگ را pH‌های ۱۲/۵، ۱۲ و ۱۲/۵ گزارش کردند که با نتایج این پژوهش کاملاً همسو است. دلیل این بیشینگی به افزایش بارهای الکترواستاتیک پروتئین‌ها و بهبود ظرفیت برهمکنش آن‌ها با آب منتسب شد. البته این روند ظاهراً در همه گونه‌ها یکسان نیست. در این رابطه به‌عنوان مثال گزارش شده است که پروتئین‌های عضله گربه‌ماهی کانال درصد حلالیت و ریکاوری پروتئین تقریباً برابر در pH‌های ۲/۵ و ۱۱/۵ نشان دادند (۳۶). در استخراج پروتئین از عضله تیلاپیا شرایط بدین نحو بود که pH‌های قلیایی (۱۱ و ۱۱/۲) حلالیت بالاتری از اسیدی (۲/۵ و ۲/۹) داشتند اما درصد رسوب پایین‌تری در pH‌های بین ۵/۱ تا ۵/۷ نشان دادند. همین مسأله سبب شده درصد ریکاوری کلی پروتئین‌ها طی فرآیند اسیدی و قلیایی تفاوت چندانی نداشته باشد (۳۵). اختلاف در نحوه واکنش مواد خام مختلف به pH‌های اسیدی یا قلیایی احتمالاً به ویژگی‌های ذاتی ماده خام (مثل مقدار و نوع پروتئین‌های در دسترس، ترکیب اسیدهای آمینه و شرایط کنفورماسیونی آن‌ها) و شرایط فیزیوشیمیایی فرآیند وابسته است.

در این کانتکس؛ اثر بخشی امواج التراسونیک بر بهبود رهایش پروتئین‌ها از مواد خام متعدد تحت تیمار مانند؛ محصولات جنبی فرآوری قزل‌آلا (۱۲) و ماهی ماکرل کامل (۳۷)؛ به درون محلول استخراج‌کننده و متعاقباً بهبود درصد بازده کل فرآیند به اثبات رسیده

التراسونیک به‌عنوان یک تکنیک سبز؛ قادر است بازدهی فرایند استخراج پروتئین از منابع دریایی را افزایش دهد. این فرایند هم‌چنین می‌تواند به اصلاح فاکتورهای فرایند مقدار کاهش مصرف آب و مواد شیمیایی کمک کند که در مرحله بهینه‌سازی به این مبحث پرداخته شده است.

است. التراسونیک سبب بهبود برهم‌کنش بین محلول استخراج‌کننده و پروتئین‌ها می‌شود. بدین نحو که انرژی تزریق شده به محلول و پروسه کاویتاسیون متعاقب سبب تخریب بیش‌تر زیست‌توده تحت تیمار شده و آزادسازی پروتئین‌ها به درون محلول را تسهیل می‌کند (۳۷). بنابراین می‌توان گفت استفاده از



شکل ۲- (a) اثر pHهای انحلال و امواج التراسونیک بر درصد پروتئین حل‌شده، رسوب داده شده، بازیابی شده و بازدهی نهایی استخراج؛ (b) ماتریکس همبستگی پیرسون بین چهار پارامتر ذکر شده. حروف متفاوت در بالای ستون‌های هر بخش نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

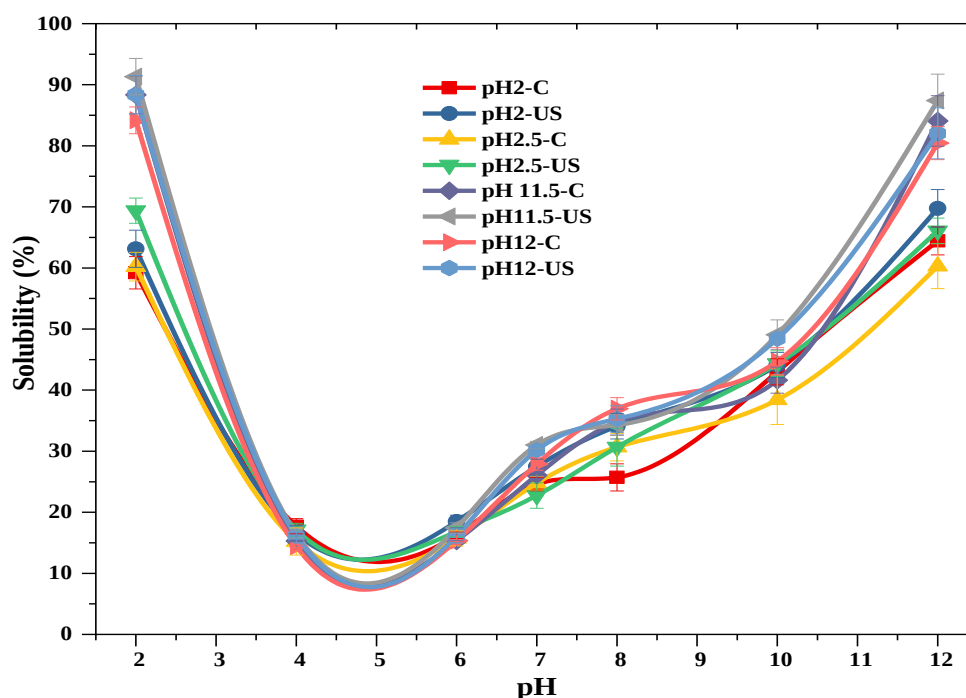
Figure 2. (a) Effect of dissolution pH and ultrasonic waves on the percentage of dissolved, precipitated, recovered protein and final extraction efficiency; (b) Pearson correlation matrix between the four mentioned parameters. Different letters at the top of the columns of each section indicate significant differences ($P < 0.05$).

آنالیز حلالیت در آب ایزوله‌های پروتئین: حلالیت کاربردی‌ترین مقیاس برای ارزیابی دناتوراسیون و تجمع؛ و بنابراین یک شاخص عملکردی بسیار مناسب برای پروتئین‌ها است (۳۸). حلالیت درواقع یک مشخصه تأثیرگذار بر کاربست‌پذیری پروتئین‌ها در سیستم‌های غذایی است و بر خیلی ویژگی‌های فانکشنال دیگر پروتئین‌ها مثل ظرفیت امولسیون‌کنندگی، کف‌کنندگی و خواص تشکیل ژل مؤثر است. همان‌طورکه در شکل ۳، ملاحظه می‌شود؛ درصد حلالیت ایزوله‌های پروتئین استخراج شده در شرایط گوناگون در بازه pH ۲ تا ۱۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. همه پروتئین‌های مورد بررسی در بازه ذکر شده یک روند U شکل نشان دادند به‌طوری‌که ماکزیموم میزان حلالیت در pH‌های شدید اسیدی و قلیایی و مقدار مینیمم آن در حدود pH ایزوالکتریک اتفاق افتاد. در بررسی مقایسه بین پروتئین‌های ایزوله‌شده با روش شیفت pH کلاسیک؛ در pH ۲ ایزوله‌های پروتئین قلیایی اکثراً درصد حلالیت بالاتری نشان دادند و ماکزیموم درصد حلالیت در نمونه pH11.5-C (۸۸/۳۴ درصد) مشاهده شد. اعمال التراسونیک سبب افزایش معنی‌دار حلالیت تمامی نمونه‌ها در این pH شد و بالاترین مقدار حلالیت در نمونه pH11.5-US (۹۱/۳۲ درصد) مشاهده شد. با حرکت به سمت ناحیه ایزوالکتریک سلسه‌مراتب درصد حلالیت نمونه‌های پروتئین تا حدی تغییر نشان داد. بدین نحوه که در pH‌های ۴ و ۶ عموماً اختلاف ناچیزی بین ورژن‌های اسیدی و قلیایی کلاسیک ملاحظه شد اما تکنیک التراسونیک اثر هرچند مثبت اما نه چندان قوی در بهبود درصد حلالیت نشان داد. مقدار حلالیت در این ناحیه در مجموع زیر ۲۰ درصد بود که با درصد حلالیت پروتئین مینس ماهی مقدماتاً بررسی شده مطابقت داشت. pH‌های ۷ و ۸ به‌عنوان نقاط اصلی در این رابطه مطرح هستند از آنجایی‌که

عملکرد پروتئین‌ها در سیستم‌های غذایی بیش‌تر در این pH‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین ایزوله مختلف در pH ۷ درصد حلالیت نسبتاً مناسبی ارائه دادند و رنج تغییرات در این نقطه بین ۲۲/۷۴ تا ۳۱/۰۲ درصد متغیر بود. این مقدار از حلالیت محاسبه شده برای پروتئین‌های ایزوله شده از ماهیان سالمون، کاد و هرینگ بالاتر بود (۱۴). در این pH نیز عملکرد نمونه‌های استخراج شده قلیایی تاحدی بهتر بود و استفاده از التراسونیک سبب بهبود حلالیت در pH‌های بررسی شده شد. ماکزیموم درصد حلالیت در این نقطه در نمونه pH11.5-US و ۳۱/۰۲ درصد مشاهده شد. در pH ۸ اثربخشی امواج التراسونیک بیش‌تر در نمونه حاصل از pH اسیدی ۲ نمود پیدا کرد که سبب افزایش ۹ درصد حلالیت شد و در باقی نمونه‌ها اثر چندانی نشان نداد. با حرکت به سمت pH‌های قلیایی درصد حلالیت همه ایزوله‌های پروتئین افزایش یافت و اثر مثبت به‌کارگیری التراسونیک در اکثر نمونه‌های استخراج شده چه اسیدی و قلیایی قبل مشاهده بود. در pH ۱۰ و ۱۱ بیشینه درصد حلالیت پروتئین‌ها در نمونه pH11.5-US و به‌ترتیب به مقادیر ۴۹/۰۸ و ۸۷/۴۲ ملاحظه شد. نمونه‌های استخراج شده اسیدی چه در حالت کلاسیک و کمک شده با التراسونیک حلالیت کم‌تری به نسبت هم‌تایان اسیدی خود ارائه کردند. حلالیت پروتئین‌ها در آب به عوامل مختلفی از جمله ویژگی‌های سطحی اسیدهای آمینه، وزن مولکولی، اندازه ذرات و شکل فضایی پروتئین‌ها بستگی دارد (۳۸، ۳۹). در رابطه با اثر مثبت کلی امواج التراسونیک بر بهبود حلالیت پروتئین‌ها در آب نتایج مشابهی توسط دیگر پژوهش‌گران گزارش شده است (۳۸، ۴۰). طبق نظر آن‌ها دلیل اصلی این افزایش حلالیت؛ کاهش اندازه ذرات پروتئین و بنابراین تقویت برهمکنش پروتئین-آب به‌دلیل افزایش سطح در معرض تحت‌تأثیر امواج التراسونیک بود

پروتئین شده (به‌عنوان بخشی از فرایند پروموت کردن دنا‌توراسیون) و حلالیت پروتئین‌ها را تسهیل می‌کند (۴۰).

(۳۸). یا به‌عبارتی می‌توان اضافه کرد نیروی فیزیکی منشأ شده از امواج التراسونیک سبب تخریب برهمکنش‌های درون ساختار تجمع‌یافته طبیعی



شکل ۳- اثر pHهای مختلف بر درصد حلالیت ایزوله‌های پروتئین استخراج شده توسط ورژن‌های کلاسیک (pHهای انحلال ۲ و pH2-C) و ۱۲ (pH12-C) و کمک شده با التراسونیک (pHهای انحلال ۲ (pH2-US) و ۱۲ (pH12-US) توام با التراسونیک) فرایند تغییر pH.

Figure 3. Effect of different pHs on the solubility percentage of protein isolates extracted by classical (dissolution pHs of 2 (pH2-C) and 12 (pH12-C)) and ultrasonically assisted (dissolution pHs of 2 (pH2-US) and 12 (pH12-US) combined with ultrasonication) versions of the pH change process.

گلوله‌های چربی و فاز آبی طی فرایند تشکیل امولسیون است (۳۸). همان‌گونه که در تصویر مشهود است روند تغییرات EAI حالت U شکل داشت و همه پروتئین‌های مورد بررسی مینیمم EAI را در pH ۵ ارائه کردند. با حرکت از نقطه ایزوالکتریک به دو سمت طیف اسیدی و قلیایی EAI پروتئین‌ها بهبود یافت. روند افزایش به سمت pHهای قلیایی شدیدتر بود و در واقع پروتئین‌های ایزوله در pHهای قلیایی EAI بالاتری ارائه کردند. این نتایج با مشاهدات عبدالمهی و آندلند (۲۰۱۸) در بررسی پروتئین‌های

آنالیز ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: بررسی خواص امولسیون‌کنندگی از منظر تعیین پتانسیل پروتئین‌ها برای کاربرد در رنج وسیعی از محصولات غذایی بر پایه امولسیون‌ها دارای اهمیت است. شکل ۴ (a و b) نتایج مرتبط با آنالیز دو ویژگی شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) و پایداری امولسیون (ESI) ایزوله‌های پروتئین مختلف را نشان می‌دهد. pHهای ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ برای این منظور انتخاب شدند. شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) نشان‌دهنده توانایی پروتئین‌ها برای جذب شدن در سطح مابین

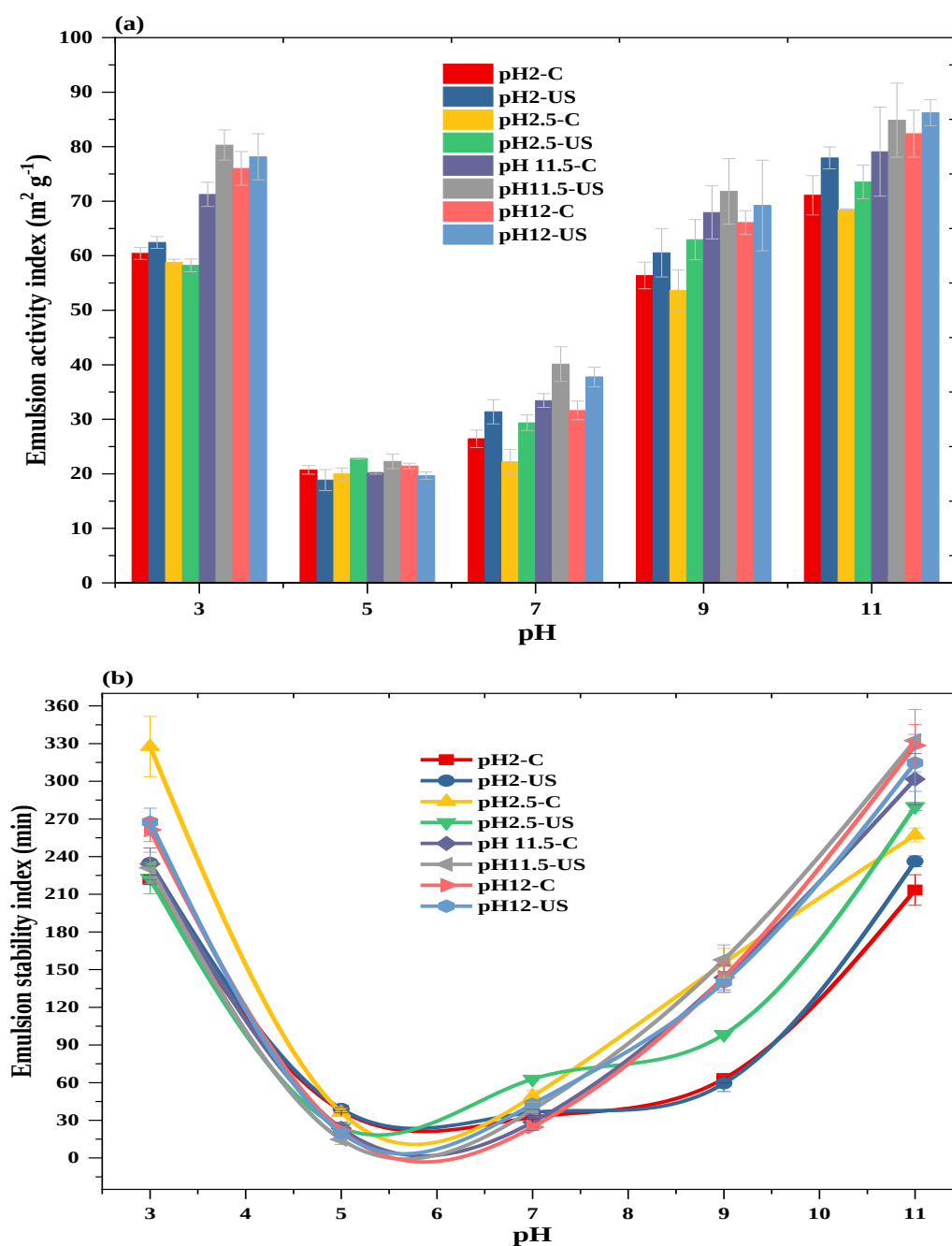
ایزوله شده از ضایعات ماهیان کاد، سالمون و هرینگ مطابقت داشت. مینیمالیتی EAI در pH ۵ قاعداً به حالیت پایین ایزوله‌های پروتئین در pHهای ۴ و ۶ مربوط است. واضح است که با دور شدن از ناحیه ایزوالکتریک بار خالص روی مولکول‌های پروتئین افزایش یافته که سبب تضعیف برهمکنش‌های مولکولی شده و بنابراین خواص امولسیون‌کنندگی را افزایش می‌دهد (چن، ژو، ژو، ژو و لیو، ۲۰۱۷). در حالت مقایسه بین ورژن‌های مختلف فرآیند تغییر pH؛ پروتئین‌های استخراج‌شده قلیایی ظرفیت امولسیون‌کنندگی بالاتر از نوع اسیدی نشان دادند؛ احتمالاً به دلیل حمل مقدار بالاتری از بارهای منفی که باز شدن مؤثرتر پروتئین‌ها و قرارگیری در فضای بین سطحی روغن-آب کمک می‌کند (۱۲). این اختلاف در pHهای دو سر طیف یعنی اسیدی و قلیایی شدید بیش‌تر و در نواحی میانی طیف مثل pHهای ۵ و ۷ کم‌تر بود. در pH ۷ (به عنوان pH اولیه ایزوله‌های پروتئین)؛ پروتئین‌های مختلف EAI را در رنج ۲۲/۲۱ (pH2.5-C) تا ۴۰/۱۳ (pH11.5-US) مترمکعب بر گرم نشان دادند. صرف‌نظر از استفاده از التراسونیک؛ بالاترین مقدار EAI در ورژن کلاسیک در نمونه pH11.5-C به مقدار ۳۳/۴۴ مترمکعب بر گرم مشاهده شد. این مقدار از EAI پروتئین ایزوله شده قلیایی ضایعات ماهی سالمون بیش‌تر اما از ماهی کاد و هرینگ کم‌تر بود (۱۴). عنوان شده است که فرآیند تغییرات کنفورماسیونی در سطح مشترک روغن-آب احتمالاً ناشی از کاهش ساختار سوم است تا دوم. دلیل این پدیده به عدم کفایت انرژی بین سطحی در سطح مشترک روغن-آب نسبت داده شده است که فاقد توانایی لازم برای غلبه بر سد انرژی فعال‌سازی برای باز شدن کامل پروتئین است. بنابراین می‌توان گفت پروتئین‌های از پیش باز شده تولید شده توسط فرآیند تغییر pH بر پروتئین‌های دست‌نخورده مزیت

دارند از آنجایی ساختار سوم آن‌ها از پیش نیمه باز شده است و در مقابل ساختار ثانویه آن‌ها بدون تغییر مانده است (۱۴). مثلاً در مورد میوزین که تشکیل‌دهنده بخشی از پروتئین‌های ایزوله‌ها بوده است؛ توصیفات فوق‌الذکر بدین معنی است که سر آن در یک حالت مولتن گلوبولار قرار داشته است. با لحاظ کردن امواج التراسونیک در فرآیند تغییر pH؛ در اکثر نقاط ظرفیت تشکیل امولسیون بهبود یافت. این بهبود در حدود نقطه ایزوالکتریک (pH ۵) اندک و در مواردی البته (مثلاً در نمونه پروتئین pH12-US به نسبت pH12-C) کاهش یافت. در pH ۷ امواج التراسونیک سبب افزایش معنی‌دار EAI شدند به گونه‌ای در نمونه pH11.5-US این شاخص به ۴۰/۱۴ مترمکعب بر گرم رسید. تیمار با امواج التراسونیک به دلیل ایجاد تغییرات ساختاری باعث افزایش نسبت سطح به حجم پروتئین شده و به این معنی که بخش بیش‌تری از پروتئین در تشکیل لایه بین‌سطحی شرکت کرده و در نتیجه کارایی تشکیل امولسیون بهبود می‌یابد. تیمار با امواج التراسونیک به دلیل ایجاد تغییرات ساختاری باعث افزایش نسبت سطح به حجم پروتئین شده و به این معنی که بخش بیش‌تری از پروتئین در تشکیل لایه بین‌سطحی شرکت کرده و در نتیجه کارایی تشکیل امولسیون بهبود می‌یابد. همچنین، افزایش آبگریزی سطح و انعطاف‌پذیری مولکول در حین دنا توره شدن پروتئین منجر به جذب مؤثرتر مولکول‌های پروتئین در سطح مشترک آب و روغن می‌شود (۳۸). در مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۲۳) روی ضایعات ماهی هرینگ؛ امواج التراسونیک در pH ۷ سبب کاهش و در pH ۱۱ عامل بهبود ظرفیت تشکیل امولسیون شدند. این نتایج به‌طور کلی با مشاهدات حاصل از بررسی درصد حالیت و هیدروفوبیسته سطح هم‌راستا بودن به‌نحوی که نمونه‌های دارای درصد حالیت و

هیدروفوبیسته سطح بیش‌تر عموماً ظرفیت امولسیون‌کنندگی بالاتری داشتند. بالاتر بودن هیدروفوبیسته؛ انرژی سدکننده در سطح مشترک روغن-آب را کاهش داده و بنابراین سبب افزایش جذب امولسیفایر می‌شود (۱۵). در مجموع تکنیک التراسونیک به دلیل ایجاد دنا تراسیون جزئی، برهم خوردن ساختار، تغییر در توزیع اندازه ذرات و سطح ویژه می‌تواند پتانسیل جذب بهتر پروتئین‌ها در سطح مشترک آب و روغن را فراهم کند (۳۸). در مجموع چگونگی جذب اولیه پروتئین‌ها به سطح مشترک و عمل به‌عنوان یک عامل امولسیون‌کننده را دو فاکتور تعیین می‌کند؛ نخست حلالیت که سبب دسترسی پروتئین‌ها به سطح مشترک می‌شود و دوم مقدار هیدروفوبیسته که قابلیت تماس اثربخش گروه‌های غیرقطبی با فاز روغن را فراهم می‌کند (۴۱). بنابراین مقدار کم‌تر EAI در پروتئین‌های ایزوله اسیدی نسبت به قلیایی؛ و هم‌چنین EAI ایزوله‌های پروتئین استخراج شده توسط فرایند تغییر pH کلاسیک نسبت به انواع کمک شده با التراسونیک را می‌توان به هیدروفوبیسته و درصد حلالیت کم‌تر آن‌ها نسبت داد. نتایج مشابهی در مورد ارتباط مثبت حلالیت و هیدروفوبیسته با EAI در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است (۱۴، ۳۸).

نتایج حاصل از بررسی ESI در نگاه کلی روندی مشابه EAI ارائه کردند اما در جزئیات امر اختلافاتی مشاهده شد. امولسیون‌ها سیستم‌های ترمودینامیکی ناپایداری هستند. عوامل متعددی بر پایداری امولسیون تأثیر می‌گذارند، از جمله وارونگی فاز، لخته شدن، تجمع و ادغام ذرات پراکنده (۳۸). در pH ۳؛

ایزوله‌های پروتئین pH2-C و pH2.5-C به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار پایداری را ارائه کردند. نمونه‌های استخراج شده قلیای کلاسیک و کمک شده با التراسونیک مجموعاً در این ESI pH مناسبی ارائه کردند. در pH ۵ تمامی نمونه‌ها ESI نسبتاً پایین ارائه کردند. ناپایداری امولسیون‌ها معمولاً زمانی رخ می‌دهد که مقدار کافی از سورفکتانت برای پوشاندن کامل سطح مشترک تشکیل شده در طی همگن‌سازی وجود نداشته باشد (۴۲). اگر فرض کنیم سطح حضور پروتئین‌ها در سیستم امولسیونی در شکل‌گیری غشای محافظ پایدار تأثیر داشته باشد این افت ESI در این pH بیش‌تر با کم‌تر بودن حلالیت پروتئین‌ها در این نقطه مرتبط است. در pH ۷ نمونه pH2.5-US ماکزیموم ESI را نشان داد. در pH‌های قلیایی نمونه‌های استخراج شده قلیایی کلاسیک و توأم با التراسونیک در مجموع ESI بالاتری در مقایسه هم‌تایان اسیدی خود ارائه کردند. ویژگی لایه بین‌سطحی روغن-آب تشکیل شده توسط عامل امولسیون‌کننده تعیین‌کننده میزان ESI است. این افزایش مشاهده شده در ESI پروتئین‌های تحت اثر التراسونیک می‌تواند به تغییرات ساختاری ایجاد شده و هم‌چنین تغییرات شیمی سطح؛ که به بازآرایی پروتئین‌ها در سطح مشترک آب-روغن، ایجاد برهمکنش‌ها و تشکیل فیلم‌های پایدارتر کمک می‌کند نسبت داده شود (۴۳). اثر مثبت التراسونیک بر بهبود پایداری امولسیون پروتئین‌ها در پژوهش‌های مشابه تأیید شده است (۱۲، ۳۸، ۴۴).



شکل ۴- اثر pHهای مختلف بر شاخص‌های (a) ظرفیت امولسیون‌کنندگی (EAI) و (b) پایداری امولسیون (ESI) ایزوله‌های پروتئین استخراج شده توسط ورژن‌های کلاسیک (pHهای انحلال ۲ (pH2-C) و ۱۲ (pH12-C)) و کمک شده با التراسونیک (pHهای انحلال ۲ (pH2-US) و ۱۲ (pH12-US) توأم با التراسونیک) فرآیند تغییر pH.

Figure 4. Effect of different pH on (a) emulsifying ability (EAI) and (b) emulsion stability (ESI) indices of protein isolates extracted by classical (dissolution pHs of 2 (pH2-C) and 12 (pH12-C)) and ultrasonically assisted (dissolution pHs of 2 (pH2-US) and 12 (pH12-US) combined with ultrasonication) versions of the pH-shifting process.

آنالیز ویژگی‌های کف‌کنندگی: نتایج حاصل از بررسی دو شاخص ظرفیت کف‌کنندگی (FC) و پایداری کف (FS) ایزوله‌های پروتئین مختلف به‌عنوان تابعی از pH در شکل ۵ (a و b) به تصویر کشیده شده است. ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین‌ها نیز رفتاری مشابه با دو آنالیز قبل یعنی درصد حلالیت و خواص امولسیون‌کنندگی نشان داد. رفتار پروتئین‌ها کاملاً تحت تأثیر pH قرار گرفته و کمینه درصد کف‌کنندگی در pH ۵ مشاهده شد و با حرکت به سمت نواحی اسیدی و قلیایی بر FC پروتئین‌ها افزوده شد. پروتئین‌ها مجموعاً در ناحیه قلیایی و pH ۱۱ FC بالاتری در مقایسه با pH ۳ نشان دادند. نتایجی مشابه با روند مشاهده شده در پژوهش حاضر توسط عبدالهی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است. هم‌چنین پروتئین‌های استخراج شده قلیایی (ورژن کلاسیک و کمک شده با التراسونیک) در اکثر pHها FC بالاتری از همتایان اسیدی خود ارائه کردند. پزشکی و همکاران (۲۰۲۱) نتایجی هم‌سو با این مشاهدات را در بررسی پروتئین‌های ایزوله شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ارائه کردند. دلیل این پدیده به تجمع بیش‌تر پروتئین‌های بازیابی شده با اسید نسبت داده شد که توانایی آن‌ها برای بازشدن در سطح مشترک آب-هوا و متعاقباً تشکیل حباب‌های کف را محدود می‌کند. به تعبیر دیگر تغییرات کنفورماسیونی و بازشدگی جزئی بیش‌تر ساختار در پروتئین‌های بازیابی شده قلیایی را می‌توان در این رابطه دخیل دانست. دلیل دیگری که می‌توان در مورد برتری این درصد FC این نوع از پروتئین‌ها در مقایسه با همتایان اسیدی ارائه کرد محتوای بالاتر پروتئین آن‌ها است که در آنالیز تقریبی نمونه‌ها کاملاً مشهود است. طبیعتاً محتوای بالاتر پروتئین (بر مبنای وزن خشک) ارائه شده به سیستم درصد FC را بهبود می‌دهد. نتایج و استدلالاتی هم‌سو با مطالب عنوان

شده توسط دیگر پژوهش‌گران گزارش شده است (۱۴). در مورد pHهای مورد استفاده برای بررسی نیز همین مکانیسم جریان دارد یعنی مثلاً pH ۱۱ سبب افزایش حلالیت پروتئین‌ها شده و به آن‌ها اجازه می‌دهد سریعاً به سطح مشترک آب/هوا مهاجرت کرده غشاهای مورد نیاز برای به دام‌اندازی هوا و تشکیل کف را تشکیل دهند (۴۱). در pH ۷ ایزوله‌های پروتئین بازآوری شده توسط تغییر pH کلاسیک؛ رنج FC را از حدود ۴۷/۲۴ تا ۶۱/۱۳ درصد ارائه کردند که این مقادیر با درصد FC گزارش شده برای پروتئین‌های قلیایی ایزوله شده از ماهیان کاد (۶۵ درصد)، سالمون (۵۳ درصد) و هرینگ (۴۸ درصد) مشابهت داشت (۱۴). امواج التراسونیک تقریباً در اکثر pHهای بررسی شده بر بهبود FC ایزوله‌های پروتئین اثر مثبت داشتند که این پدیده با اثر این امواج بر دنا‌توراسیون جزئی و در واقع اصلاح (بازشدگی) ساختار مولکولی پروتئین‌ها در ارتباط بود (۳۸). این بازشدگی ساختار همان‌طور که ذکر شد توانایی پروتئین‌ها در گسترده شدن در سطح مشترک آب-هوا و کپسوله کردن هوا را بهبود می‌دهد؛ بنابراین سبب بهبود FC می‌شود (۴۵). برای توضیح بیش‌تر می‌توان گفت فرایند تشکیل کف شامل دو مرحله اصلی است: (۱) نفوذ پروتئین‌های حل شده و جذب آن‌ها به سطح مشترک آب-هوا و بنابراین کاهش کشش سطحی و (۲) بازشدگی پروتئین و جهت‌گیری نواحی هیدروفوب به سمت فاز گازی و نواحی هیدروفیل به سمت فاز مایع برای فرض تشکیلات لوپ و تراپن (۴۶). بنابر فرآیند دو مرحله‌ای توضیح داده شده می‌توان عنوان کرد که نخست پروتئین‌های استخراج شده قلیایی و در مرحله بعد پروتئین‌های قلیایی استخراج شده با کمک امواج التراسونیک به دلیل حلالیت، هیدروفوبیسته سطح و انعطاف‌پذیری ساختاری بالاتر؛ پس از حل شدن سریع‌تر باز شده، جهت‌گیری آبدوست/آبگریز

کرده و بنابراین درصد FC نسبتاً بهتری ارائه دادند (۱۸، ۴۷).

مشابه این نتایج در پژوهش‌های مرتبط انجام شده گزارش شده است (۱۲، ۳۸، ۴۷). بازشدگی جزئی و اصلاح ساختاری را در آنالیزهای سنجش هیدروفوبیسته سطح و محتوای گروه‌های سولفیدریل فعال و همچنین حلالیت پروتئین‌ها ردیابی کرد. این سه ویژگی در نمونه‌های پروتئین استخراج شده قلیایی با کمک US بالاتر بودند.

روند تغییرات FS تحت تأثیر pHهای مختلف تا حدودی با FC تفاوت داشت. البته در اینجا نیز مینیمم درصد FS تقریباً در همه نمونه‌ها در pH ۵ مشاهده شد. یکی از دلایل این پدیده می‌تواند کم‌تر بودن محتوای پروتئین سیستم به دلیل حلالیت پایین پروتئین‌ها در این نقطه باشد. رنج تغییرات FS در پژوهش حاضر بین ۴۷ تا نهایتاً ۷۰ درصد بود که نسبت به نتایج گزارش شده در پژوهش مشابه توسط عبدالهی و آندلند (۲۰۱۸) (بالای ۹۵ درصد برای نمونه‌های مختلف پروتئین ماهی) پایین‌تر بود. پروتئین‌های استخراج شده قلیایی مجموعاً در همه pHهای تست شده درصد FS بالاتری نشان دادند. استفاده از التراسونیک در pHهای ۳، ۷ و ۱۲ تقریباً در همه نمونه‌ها سبب افزایش درصد FS شد. طبق نتایج پزشک و همکاران (۲۰۲۱) پروتئین‌های استخراج شده قلیایی کلاسیک پایداری بهتری از انواع اسیدی نشان دادند. آن‌ها همچنین عنوان کردند استفاده از التراسونیک برای استخراج پروتئین در pHهای ۲/۵، ۱۱ و ۱۱/۵ سبب بهبود FS شد. به‌طور کلی پایداری کف‌ها به پایداری فیلم پروتئینی تشکیل شده در فضای مشترک مایع-گاز و همچنین نفوذپذیری این لایه به گاز وابسته است (۴۸). همچنین توانایی بالا در ایجاد برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین می‌تواند سبب افزایش ویسکوزیته دیسپرسیون شده و امکان تشکیل فیلم‌های پروتئینی چسبنده چندلایه را در سطح

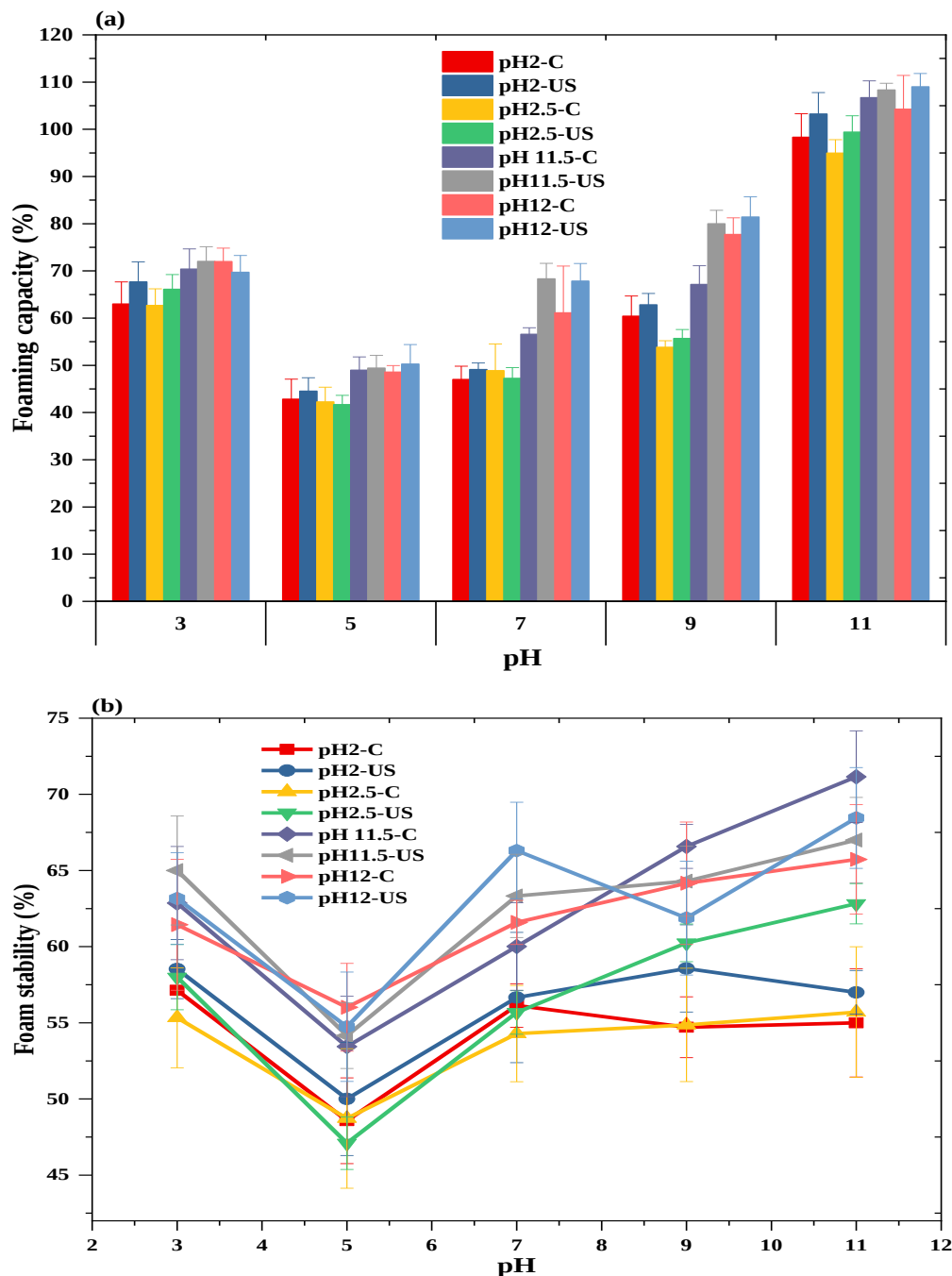
مشترک مایع-گاز فراهم کند (۴۹). این پدیده را می‌توان در آنالیز گروه‌های سولفیدریل فعال و مقدار بالاتر این گروه‌ها در نمونه‌های دارای FS بالاتر ردیابی کرد.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش هدف غایی بر تولید پروتئین ایزوله با کیفیت از نظر خواص تکنو-فانکشنال از فانوس ماهی گونه بتوسوما پترنوم به‌عنوان یک منبع نسبتاً ارزان قرار داده شد. در ابتدا به منظور کشف pHهای بهتر برای انحلال و ترسیب پروتئین‌ها؛ منحنی‌های درصد حلالیت و شاخص سفیدی آن‌ها ترسیم شدند. برطبق نتایج حاصل از ترسیم منحنی‌های ذکر شده دو pH اسیدی ۲ و ۲/۵ و دو pH قلیایی ۱۱/۵ و ۱۲ برای انحلال و pH ۵/۷ برای ترسیب پروتئین‌ها انتخاب شدند. در مرحله بعد فرآیندهای اصلی استخراج در pHهای ذکر شده به شکل کلاسیک و همچنین با کمک امواج التراسونیک انجام گرفتند. طبق نتایج pHهای قلیایی درصد پروتئین حل شده و بازدهی بیش‌تری از اسیدی ارائه کردند. بالاترین مقدار این بازدهی در pH ۱۲ ملاحظه شد. التراسونیک سبب بهبود درصد انحلال و بازدهی پروتئین در pHهای اسیدی و قلیایی شد. ویژگی‌های تکنوفانکشنال ایزوله‌های پروتئین به‌عنوان تابعی از pH از منظر درصد حلالیت، شاخص‌های ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون و شاخص‌های درصد کف‌کنندگی و پایداری کف مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع طبق نتایج ایزوله‌های پروتئین قلیایی استخراج شده درصد حلالیت، توان امولسیون‌سازی و کف‌کنندگی بالاتری از ورژن اسیدی داشتند. امواج التراسونیک به دلیل پرموت‌کردن تغییرات کنفورماسیونی ایجاد شده در اثر فرآیند تغییر pH در این رابطه اثر مثبت داشتند در پایان می‌توان عنوان کرد با توجه به ویژگی‌های خاص زیست‌توده مورد استفاده یعنی فانوس ماهیان؛

ارزان برای استفاده در سیستم‌های غذایی بر پایه ژل و امولسیون اثربخش باشد.

استفاده از روش تغییر pH قلیایی هم‌زمان با استفاده از تکنیک‌های استخراج نوین مثل التراسونیک می‌تواند در تولید کارآمد ایزوله‌های پروتئین نسبتاً با کیفیت و



شکل ۵- اثر pHهای مختلف بر شاخص‌های (a) ظرفیت کف‌کنندگی (FC) و (b) پایداری کف (FS) ایزوله‌های پروتئین استخراج‌شده توسط ورژن‌های کلاسیک (pHهای انحلال ۲ (pH2-C) و ۱۲ (pH12-C)) و کمک شده با التراسونیک (pHهای انحلال ۲ (pH2-US) و ۱۲ (pH12-US) توأم با التراسونیک) فرایند تغییر pH.

Figure 5. Effect of different pH on the indices of (a) foaming capacity (FC) and (b) foam stability (FS) of protein isolates extracted by classical (dissolution pHs of 2 (pH2-C) and 12 (pH12-C)) and ultrasonically assisted (dissolution pHs of 2 (pH2-US) and 12 (pH12-US) combined with ultrasonication) pH-shifting process.

منابع

1. Wiech, M., Silva, M., Meier, S., Tibon, J., Berntssen, M. H., Duinker, A., & Sanden, M. (2020). Undesirables in mesopelagic species and implications for food and feed safety-insights from Norwegian Fjords. *Foods*, 9(9), 1162.
2. Dinakarkumar, Y., Krishnamoorthy, S., Margavelu, G., Ramakrishnan, G., & Chandran, M. (2022). Production and characterization of fish protein hydrolysate: Effective utilization of trawl by-catch. *Food Chemistry Advances*, 1, 100138.
3. Shaviklo, A. R. (2020). A comprehensive review on animal feed, human food and industrial application of lanternfishes; from prototypes to products. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(11).
4. Shaviklo, A. R., & Rafipour, F. (2013). Surimi and surimi seafood from whole ungutted myctophid mince. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 463-468.
5. Chai, H. J., Chan, Y. L., Li, T. L., Shiau, C. Y., & Wu, C. J. (2013). Evaluation of lanternfish (*Benthoosema pterotum*) hydrolysates as antioxidants against hydrogen peroxide induced oxidative injury. *Food research international*, 54(2), 1409-1418.
6. Chai, H. J., Chan, Y. L., Li, T. L., Chen, Y. C., Wu, C. H., Shiau, C. Y., & Wu, C. J. (2012). Composition characterization of Myctophids (*Benthoosema pterotum*): Antioxidation and safety evaluations for Myctophids protein hydrolysates. *Food Research International*, 46(1), 118-126.
7. Kristinsson, H. G., & 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.
8. Hayes, M., Mora, L., Hussey, K., & Aluko, R. E. (2016). Boarfish protein recovery using the pH-shift process and generation of protein hydrolysates with ACE-I and antihypertensive bioactivities in spontaneously hypertensive rats. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 253-260.
9. Kakko, T., Aitta, E., Laaksonen, O., Tolvanen, P., Jokela, L., Salmi, T., ... & Yang, B. (2022). Baltic herring (*Clupea harengus membras*) protein isolate produced using the pH-shift process and its application in food models. *Food Research International*, 158, 111578.
10. Nisov, A., Kakko, T., Alakomi, H. L., Lantto, R., & Honkapää, K. (2022). Comparison of enzymatic and pH shift methods to extract protein from whole Baltic herring (*Clupea harengus membras*) and roach (*Rutilus rutilus*). *Food Chemistry*, 373, 131524.
11. Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A., & Undeland, I. (2017). Dynamic rheological, microstructural and physicochemical properties of blend fish protein recovered from kilka (*Clupeonella cultriventris*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by the pH-shift process or washing-based technology. *Food Chemistry*, 229, 695-709.
12. Pezeshk, S., Rezaei, M., Hosseini, H., & Abdollahi, M. (2021). Impact of pH-shift processing combined with ultrasonication on structural and functional properties of proteins isolated from rainbow trout by-products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106768.
13. van Berlo, E., Undeland, I., & Abdollahi, M. (2023). Physicochemical and functional properties of protein isolated from herring co-products; effects of catching season, pre-sorting, and co-product combination. *Food Chemistry*, 398, 133947.
14. Abdollahi, M., & Undeland, I. (2018). Structural, functional, and sensorial properties of protein isolate produced from salmon, cod, and herring by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1733-1749.
15. Zhang, J., Ström, A., Bordes, R., Alminger, M., Undeland, I., & Abdollahi, M. (2023). Radial discharge

- high shear homogenization and ultrasonication assisted pH-shift processing of herring co-products with antioxidant-rich materials for maximum protein yield and functionality. *Food Chemistry*, 400, 133986.
16. Yoon, I. S., Lee, H. J., Kang, S. I., Park, S. Y., Kang, Y. M., Kim, J. S., & Heu, M. S. (2019). Food functionality of protein isolates extracted from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) roe using alkaline solubilization and acid precipitation process. *Food Science & Nutrition*, 7(2), 412-424.
17. Cha, J. W., Yoon, I. S., Lee, G. W., Kang, S. I., Park, S. Y., Kim, J. S., & Heu, M. S. (2020). Food functionalities and bioactivities of protein isolates recovered from skipjack tuna roe by isoelectric solubilization and precipitation. *Food Science & Nutrition*, 8(4), 1874-1887.
18. Nguyen, T. T., Luo, X., Su, P., Balakrishnan, B., & Zhang, W. (2020). Highly efficient recovery of nutritional proteins from Australian Rock Lobster heads (*Jasus edwardsii*) by integrating ultrasonic extraction and chitosan co-precipitation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 60, 102308.
19. Abdollahi, M., Axelsson, J., Carlsson, N. G., Nylund, G. M., Albers, E., & Undeland, I. (2019). Effect of stabilization method and freeze/thaw-aided precipitation on structural and functional properties of proteins recovered from brown seaweed (*Saccharina latissima*). *Food Hydrocolloids*, 96, 140-150.
20. Xu, H., Pan, J., Dabbour, M., Mintah, B. K., Chen, W., Yang, F., ... & Ma, H. (2023). Synergistic effects of pH shift and heat treatment on solubility, physicochemical and structural properties, and lysinoalanine formation in silkworm pupa protein isolates. *Food Research International*, 165, 112554.
21. Tahergorabi, R., Sivanandan, L., & Jaczynski, J. (2012). Dynamic rheology and endothermic transitions of proteins recovered from chicken-meat processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation and addition of TiO₂. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 148-155.
22. Zhang, W., Liu, C., Zhao, J., Ma, T., He, Z., Huang, M., & Wang, Y. (2021). Modification of structure and functionalities of ginkgo seed proteins by pH-shifting treatment. *Food chemistry*, 358, 129862.
23. Shen, Q., Dai, H., Wen, L., Zheng, W., Li, B., Dai, J., ... & Chen, Y. (2023). Effects of pH-shifting treatments on the emulsifying properties of rice protein isolates: Quantitative analysis of interfacial protein layer. *Food Research International*, 164, 112306.
24. Zhao, X., Xing, T., Chen, X., Han, M. Y., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2017). Yield, thermal denaturation, and microstructure of proteins isolated from pale, soft, exudative chicken breast meat by using isoelectric solubilization/precipitation. *Process Biochemistry*, 58, 167-173.
25. Gomez, L. P., Alvarez, C., Zhao, M., Tiwari, U., Curtin, J., Garcia-Vaquero, M., & Tiwari, B. K. (2020). Innovative processing strategies and technologies to obtain hydrocolloids from macroalgae for food applications. *Carbohydrate polymers*, 248, 116784.
26. Leong, Y. K., Yang, F. C., & Chang, J. S. (2021). Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117006.
27. Ummat, V., Sivagnanam, S. P., Rajauria, G., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2021). Advances in pre-treatment techniques and green extraction technologies for bioactives from seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 90-106.
28. Wang, K., Zhang, Y., & Sun, J. (2023). Synergistic effect of high-intensity ultrasound and pH-shifting on the functionalities of chicken wooden breast myofibrillar protein: Reveal the mechanism of protein structure change. *LWT*, 181, 114743.

29. Sun, Y., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., & Zhang, M. (2022). Effect of ultrasound on pH-shift to improve thermal stability of coconut milk by modifying physicochemical properties of coconut milk protein. *Lwt*, 167, 113861.
30. Nasrabadi, M. N., Doost, A. S., & Mezzenga, R. (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106789.
31. Santschi, M. V., Undeland, I., & Abdollahi, M. (2023). Ultrasound-aided pH-shift processing for resource-smart valorization of salmon and herring side streams. *Ultrasonics Sonochemistry*, 99, 106539.
32. Abdollahi, M., & Undeland, I. (2019). Physicochemical and gel-forming properties of protein isolated from salmon, cod and herring by-products using the pH-shift method. *Lwt*, 101, 678-684.
33. Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food chemistry*, 53(3), 285-293.
34. Kristinsson, H. G., Theodore, A. E., Demir, N., & Ingadottir, B. (2005). A comparative study between acid-and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. *Journal of food science*, 70(4), 298-306.
35. Kristinsson, H. G., & Ingadottir, B. (2006). Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. *Journal of Food Science*, 71(3), 132-141.
36. Kristinsson, H. G., Theodore, A. E., Demir, N., & Ingadottir, B. (2005). A comparative study between acid-and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. *Journal of food science*, 70(4), 298-306.
37. Álvarez, C., Lélou, P., Lynch, S. A., & Tiwari, B. K. (2018). Optimised protein recovery from mackerel whole fish by using sequential acid/alkaline isoelectric solubilization precipitation (ISP) extraction assisted by ultrasound. *Lwt*, 88, 210-216.
38. Amiri, A., Sharifian, P., & Soltanizadeh, N. (2018). Application of ultrasound treatment for improving the physicochemical, functional and rheological properties of myofibrillar proteins. *International journal of biological macromolecules*, 111, 139-147.
39. Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food chemistry*, 212, 648-656.
40. Zhang, Z., Regenstein, J. M., Zhou, P., & Yang, Y. (2017). Effects of high intensity ultrasound modification on physicochemical property and water in myofibrillar protein gel. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 960-967.
41. Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., & Rana, J. C. (2015). Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679-689.
42. Dalgleish, D. G. (1997). Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in food science & technology*, 8(1), 1-6.
43. Zhu, Z., Zhu, W., Yi, J., Liu, N., Cao, Y., Lu, J., ... & McClements, D. J. (2018). Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. *Food Research International*, 106, 853-861.
44. Yanjun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., Hongjuan, L., Jing, L., Lu, L., ... & Jiaping, L. (2014). Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 124, 11-18.

- 45.Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2019). Physicochemical, molecular and thermal properties of high-intensity ultrasound (HIUS) treated protein isolates from album (*Chenopodium album*) seed. *Food Hydrocolloids*, 96, 433-441.
- 46.Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food reviews international*, 34(2), 126-147.
- 47.Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of food engineering*, 86(2), 281-287.
- 48.Barać, M., Čabrilo, S., Pešić, M., Stanojević, S., Pavličević, M., Mačej, O., & Ristić, N. (2011). Functional properties of pea (*Pisum sativum* L.) protein isolates modified with chymosin. *International journal of molecular sciences*, 12(12), 8372-8387.
- 49.Panpipat, W., & Chaijan, M. (2017). Functional properties of pH-shifted protein isolates from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) head by-product. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 596-610.

