

نسخه قبل از انتشار

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

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

۱. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. kazemi_mohsen@yahoo.com

seafood1144@yahoo.com

۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران، دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی،

دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایان نامه: ojagh@ut.ac.ir

۳. گروه بیولوژی و مهندسی زیستی-تغذیه و علوم غذایی دانشگاه صنعتی چالمرز، سوند. abdollahi.mkh@gmail.com

*نویسنده مسئول مقاله: ojagh@ut.ac.ir

چکیده:

فرآیند اصطلاحاً موسوم به pH-shift (تغییر pH)؛ به عنوان یک تکنیک نویددهنده و امیدبخش در جهت بازیابی پروتئین‌های عضله از موادخام دریایی پیچیده و اصلاح آنها شناخته شده است. تکنیک التراسونیک نیز به خصوص در مواردی که بازدهی به خطر می افتد و همچنین بعنوان یک فاکتور اصلاح کننده می تواند مفید باشد. 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 به منظور کشف pH های بهتر برای انحلال و ترسیب پروتئین‌ها؛ منحنی‌های درصد حلالیت و شاخص سفیدی آنها ترسیم شدند. برطبق نتایج حاصل از ترسیم منحنی -های 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 استخراج در pH های ذکر شده به شکل کلاسیک و همچنین با کمک امواج التراسونیک انجام گرفتند. طبق نتایج pH های 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 pH های اسیدی و قلیایی شد. بیشترین درصدهای بازدهی کل پروتئین در ورژن‌های قلیایی تغییر pH کمک شده با التراسونیک (pH های ۱۱.۵ و ۱۲ با درصد بازدهی کل ۴۷.۳۱ و ۴۹.۰۱) بدست آمدند. ویژگی‌های تکنوفانتکشنال ایزوله‌های پروتئین بعنوان تابعی از pH از منظر درصد حلالیت، شاخص‌های ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون و شاخص‌های درصد کف کنندگی و پایداری کف مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع طبق نتایج ایزوله‌های پروتئین قلیایی استخراج شده درصد حلالیت، توان امولسیون سازی و کف کنندگی بالاتری از ورژن اسیدی داشتند. امواج التراسونیک به دلیل پرموت کردن تغییرات کنفورماسیونی ایجاد شده در اثر فرآیند تغییر pH در این رابطه اثر مثبت داشتند. در پایان می توان عنوان کرد با توجه به ویژگی‌های خاص زیست توده مورد استفاده یعنی فانوس ماهیان؛ استفاده از روش تغییر pH قلیایی همزمان با استفاده از تکنیک‌های استخراج نوین مثل التراسونیک می تواند در تولید کارآمد ایزوله‌های پروتئین نسبتاً با کیفیت و ارزان برای استفاده در سیستم‌های غذایی بر پایه ژل و امولسیون اثر بخش باشد.

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 موثر 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 [1,2]. 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 [1]. ماهیان غیرتجاری منظور زیست‌توده‌ای است که اغلب به شکل صید ضمنی و یا با اهدافی غیر از مصارف انسانی صید می‌شوند. این محصولات طی فرآیند صید ضمنی به دلایلی نظیر 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 [3]. 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 تخمین زده می‌شود که معادل ۱۰۰ برابر میزان صید سالانه صید تجاری است [1,2]. فانوس ماهیان فون غالب (تشکیل دهنده بالغ بر ۷۰ درصد) از ماهیان ناحیه مزوپلاژیک در جهان هستند. اکثر فانوس ماهیان به دلیل وجود مقادیر بالای استر واکس در چربی بدن به‌عنوان غذای انسان قابل استفاده نیستند. درواقع کمتر از ۱۰ گونه از ۴۰۵ گونه میکتوفید خوراکی هستند. میکتوفیدها از نظر تغذیه و اقتصادی به‌واسطه تامین مواد اولیه برای صنایع پودر ماهی و همچنین مصارف انسانی حائز اهمیت جهانی هستند [4]. *B. pterotum* که به نام کلی فانوس ماهی نیز شناخته می‌شود، یک نمونه از گونه‌های خوراکی با منشا مزوپلاژیک و بزرگترین ذخیره میکتوفیده در دریای عمان (بر طبق آمار فائو در سال ۲۰۰۷) و دریای چین شرقی است. این ماهی بعنوان زیست توده غنی از مواد مغذی (منبع خوبی از پروتئین‌ها، چربی‌ها و موادمعدنی) به طور سنتی به عنوان صید جانبی تلقی شده و اغلب برای تولید پودر ماهی و روغن کم ارزش در خوراک دام استفاده می‌شود [4-6]. با این وجود، فانوس ماهیان بعنوان 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 قرارگیرند [7]. از موانع موجود در استفاده از گونه *B. pterotum* به‌عنوان غذای انسان به‌طور ویژه به مشکلاتی نظیر اندازه خیلی کوچک، فسادپذیری بالا، رنگ تیره عضله و محتوای واکس‌های استری اشاره شده [7]. بر طبق بررسی مقدماتی و تجربیات نویسندگان *B. pterotum* یک ماهی کوچک (حداکثر اندازه ۴ تا ۵ سانتی متر) 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 رنگدانه های ملانین در اندام ها؛ مینس آن کاملاً تیره می شود که سبب می شود جداسازی پروتئین ها از طریق رویکردهای مرسوم نظیر تولید سوریمی بغرنج باشد [8].

انحلال قلیایی و یا اسیدی پروتئین ها و در ادامه ترسیب در ناحیه ایزوالکتریک باهدف جداسازی انتخابی پروتئین ها از مواد خام؛ فرآیندی اصطلاحاً موسوم به پروسه pH-shift (تغییر pH)؛ به عنوان یک تکنیک نویددهنده و امیدبخش در جهت بازیابی پروتئین های عضله از موادخام دریایی پیچیده، نظیر ماهیان تیره گوشت چرب کامل و تخلیه شکمی شده، محصولات برجای مانده از خط تولید آبیان، صدف های آبی و کریل شناخته شده است [9]. این تکنیک از زمان اختراع آن (Hultin and Keller, 1999; Hultin et al., 2003) به طور موفقیت آمیز برای استخراج پروتئین از مواد خام خاص و پیچیده ای از جمله ماهی های کوچک سطحی چرب کامل و تخلیه شکمی شده [10-12]، فرآورده های جانبی برجای مانده از خط فرآوری انواع ماهیان [13-16]، تخم ماهی [17,18]، فرآورده های جانبی سخت پوستان [19]، ماکرو جلبک های دریایی [20] و برخی از ارگانسیم های خشکی مانند شفیره کرم ابریشم [21]، محصولات جنبی برجای مانده از فرآوری مرغ [22] و دانه های گیاه جینگو (Zhang et al., 2021) مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این روش تغییر pH به نوبه خود به طور موثر برای اصلاح خواص عملکردی پروتئین هایی مانند پروتئین ایزوله برنج [24]، پروتئین دانه جینگو [23]، پروتئین ایزوله شده از گوشت سینه مرغ [25] و پروتئین ایزوله شده از شفیره کرم ابریشم [21] استفاده شده است. در طی این فرآیند، پروتئین ها تحت باز شدن جزئی ناشی از pH های بسیار بالا یا پایین قرار می گیرند و سپس هنگام تنظیم pH به خنثی یا نقطه ایزوالکتریک، دوباره تا می شوند. این تا شدن مجدد ساختار و شکل اصلی اولیه را بازیابی نمی کند و حالتی به نام "مولتن گلوبول" را تشکیل می دهد که ساختار و کارکرد پروتئین ها را متفاوت می کند [21]. با وجود استفاده گسترده از پروتکل های سنتی و مرسوم استخراج در سطح صنعتی، گرایش فزاینده ای برای استفاده از فناوری های نوآورانه برای بهبود کارایی استخراج ترکیبات زیستی وجود دارد. هدف اصلی از به کارگیری تکنیک های جدید، بهبود کارایی فرآیند نسبت به روش های مرسوم از طریق افزایش بازده استخراج و همزمان کاهش زمان و انرژی مصرفی فرآیند است. نوید دهنده ترین تکنیک های نوظهور مطرح شده در منابع مختلف؛ استفاده از امواج میکروویو، فراصوت، فشار بالا، آنزیم ها و فرآیندهایی مثل استفاده از اکستروژن واکنشی و فوتوبلیچینگ می باشند [26]. تکنیک التراسونیک به خصوص در مواردی که بازدهی به خطر می افتد می تواند مفید باشد. کارایی استخراج با کمک امواج اولتراسونیک به عنوان یک روش جایگزین برای بازیابی ترکیبات زیستی به طور گسترده مورد ارزیابی قرار گرفته است. این روش از اثر کاویتاسیون (جوشش سیال در اثر افت فشار نه افزایش دما) ناشی از تشکیل حفره های صوتی در حلال و فروپاشی میکرو حباب های نامتقارن استفاده می کند. این پدیده مقدار زیادی انرژی آزاد کرده و سبب تولید ریز جت ها، امواج ضربه ای و نیروی برشی بالا می شود. نیروهای هیدرودینامیکی ایجاد شده با تاثیر 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 می دهند. [19,27,28]. تکنیک التراسونیک همچنین پتانسیل استفاده بعنوان یک عامل بهبوددهنده ویژگی های عملکردی پروتئین ها را داراست. این امواج با ایجاد تغییراتی در ساختار پروتئین؛ از طریق شکستن پیوندهای مولکولی غیر کووالانسی (نسبت به پیوندهای کووالانسی و بنابراین ساختار اول پروتئین بی اثر است) از قبیل پیوندهای هیدروژنی و نیروهای الکترواستاتیکی که سبب تغییر ساختار ثانویه و همچنین

دنا توره شدن جزئی ساختارهای سوم و چهارم می شوند؛ منجر به در معرض قرار گرفتن برخی از گروه های عاملی مانند گروه های آبگریز و سولفیدریل شده و در نتیجه بر ویژگی های فانکشنال پروتئین ها معمولا اثر مثبت دارند [31-29]. استفاده از امواج التراسونیک همچنین می تواند محدودیت های روش تغییر pH به منظور کاربرد در فرآیندهای استخراج پروتئین با مقیاس بالا (صنعتی / نیمه صنعتی) را کاهش دهد (به عنوان مثال کمک به استفاده کمتر از حلال ها و/یا مواد شیمیایی مورد استفاده) [32]. در این رابطه اثر سینرژیستیک روش تغییر pH (نسخه قلیایی) و تکنیک التراسونیک، بازدهی استخراج را به حداکثر رسانده و ویژگی های عملکردی (ظرفیت های امولسیون کنندگی و کف کنندگی) و کیفیت تغذیه ای (ترکیب اسید آمینه و قابلیت هضم پروتئین) را به ترتیب در پروتئین های استخراج شده از محصولات جنبی ماهی قزل آلائی رنگین کمان [13] و لابستر [19] بهبود بخشید. این اثرات سینرژیستیک مثبت در ارتقا ویژگی های ساختاری و عملکردی پروتئین حاصل از شیر نارگیل نیز اثبات شده است [30]. امواج اولتراسوند با شدت بالا در هر دو مرحله باز شدن و تاشدن پروتئین ها در فرآیند تغییر pH برای بهبود خواص عملکردی پروتئین ناحیه سینه مرغ به کار گرفته شدند. نتایج نشان داد نمونه های تیمار شده با تکنیک التراسونیک در مرحله باز شدن پروتئین ها؛ حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی و رئولوژی بالاتری داشتند. نتایج حاصل از بررسی پتانسیل زتا و اندازه ذرات نشان دادند امواج التراسونیک به طور قابل توجهی ساختار پروتئین را تغییر دادند. طیف سنجی فلورسانس نشان داد آبگریزی پروتئین ها تحت تاثیر امواج التراسونیک به طور قابل توجهی کاهش یافت. همچنین طبق نتایج امواج التراسونیک سبب تبدیل ساختار مارپیچ آلفا به صفحات بتا شد. در مجموع بر طبق نتیجه گیری محققان؛ اعمال امواج التراسونیک فقط در مرحله باز شدن پروتئین ها دارای تاثیر مثبت بود [29].

بنابراین در این مطالعه از اثر همزمان این دو تکنیک برای افزایش بازدهی استخراج و اصلاح خواص عملکردی پروتئین های جدا شده از عضله فانوس ماهی استفاده شد. در ابتدا به منظور کشف pH های بهتر برای انحلال و ترسیب پروتئین ها؛ منحنی های درصد حلالیت و شاخص سفیدی آنها ترسیم شدند. در ادامه پس از استخراج پروتئین های عضله در شرایط بهینه تعیین شده؛ ویژگی های تکنوفانشکال ایزوله های پروتئین بعنوان تابعی از pH از منظر درصد حلالیت، شاخص های ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون و شاخص های درصد کف کنندگی و پایداری کف مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش

تهیه و آماده سازی نمونه ماهی و سایر مواد مورد نیاز پژوهش

طی دو روز پس از صید، بلوک های منجمد (هر کدام حدود ۱۲ کیلوگرم) فانوس ماهیان (*B. pterotum*) از کشتی صید ترال کاویان در ساحل بندرعباس تهیه شدند. این بلوک ها (به صورت 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 استفاده شده در این تحقیق از گرید آزمایشی و دارای خلوص مناسب بودند.

پیاده سازی روش تغییر pH کلاسیک و کمک شده با امواج التراسونیک با هدف استخراج پروتئین ها

نمونه های ماهی پس از ورود به آزمایشگاه؛ ابتدا زیر آب جاری انجمادزایی و شسته شده و سپس با استفاده از یک چرخ گوشت رومیزی چرخ شدند. قبل از اعمال فرآیند اصلی استخراج؛ ارزیابی های مقدماتی برای یافتن بهینه ترین pH ها برای انحلال و رسوب پروتئین ها طبق روش قبلا توضیح داده شده توسط آندلند و همکاران (۲۰۰۳) صورت پذیرفت. بدین صورت که ابتدا گوشت چرخ شده

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-). محلول حاصل به بخش‌های مورد نیاز تقسیم شده و pH آنها با استفاده از HCl و NaOH (۰.۲ و ۲ نرمال) در حواصل بین ۱.۵ تا ۱۲.۵ تنظیم شد. پس از نگهداری به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد؛ نمونه‌ها در سانتریفیوژ از پیش سرد شده (۴ درجه سانتی گراد) (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 (معادله 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 سانتی گراد (باهدف تکمیل فرآیند رسوب)، با نیروی گریز از مرکز ۸۵۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد تا پروتئین‌های رسوب کرده آبگیری شوند. به همین ترتیب شاخص سفیدی پروتئین‌های به‌دست آمده 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 ریکآوری 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 سانتی گراد، 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 محافظ-های سرمایی (۴٪) (وزنی/وزنی) ساکارز و ۴٪ (وزنی/وزنی) سوربیتول طبق رطوبت ۸۰٪ در پروتئین‌ها تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد 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 عبدالحی و همکاران محاسبه شدند [33]. محتوای پروتئین (PC) در محلول‌های همگن‌شده در pH موردنظر (H)، سوپرناتانت مرحله اول (S1) و سوپرناتانت مرحله دوم (S2) با استفاده از روش‌های کج‌لدال و بیورت تعیین شدند. وزن‌های (W) گوشت چرخ‌شده (M) و ایزوله‌های پروتئینی استخراج‌شده (RPI) در سطح رطوبت برابر اندازه‌گیری شدند.

$$\text{SP(\%)} = \frac{\text{PC of S1 (mg)}}{\text{PC of H (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{PP(\%)} = \frac{\text{PC of S1 (mg)} - \text{PC of S2 (mg)}}{\text{PC of S1 (mg)}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{RP(\%)} = \frac{\text{PC of S1 (mg)} - \text{PC of S2 (mg)}}{\text{PC of H (mg)}} \times 100 \quad (4)$$

$$TY(\%) = \frac{W \text{ of } RPI(g)}{W \text{ of } M(g)} \times 100 \quad (5)$$

سنجش ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها:

درصد حلالیت در آب

برای اندازه‌گیری قابلیت حلالیت در آب پروتئین‌ها؛ ابتدا ۱ گرم از هر نمونه پروتئین (بر اساس 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 پروتئین سوپرناتانت با استفاده از روش بیورت تعیین شد و درصد حلالیت در آب پروتئین‌ها مطابق معادله زیر (۶) محاسبه شد.

$$\text{Protein water solubility } (\%) = \frac{C_s}{C_{max}} \times 100 \quad (6)$$

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 تاحدی اصلاح‌شده Shahidi et al. (1995) استفاده شد. ۰.۲۵ گرم از نمونه پروتئین (بر اساس وزن خشک) به طور 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 (rpm ۱۰۰۰۰) به مدت ۲ دقیقه همگن شدند. معادلات زیر (۱۰ و ۱۱) برای محاسبه مقادیر FC و FS استفاده شدند.

$$FC (\%) = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100 \quad (7)$$

$$FS (\%) = \frac{V_{60} - V_0}{V_0} \times 100 \quad (8)$$

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 (بر اساس 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٪ مخلوط شد؛ و عدد جذب آن در ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. دو ویژگی EAI و ESI از طریق معادله‌های زیر (۱۲ و ۱۳) 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 نرم افزار SPSS (نسخه ۲۶) انجام شد. داده‌ها ابتدا با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین نمونه‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

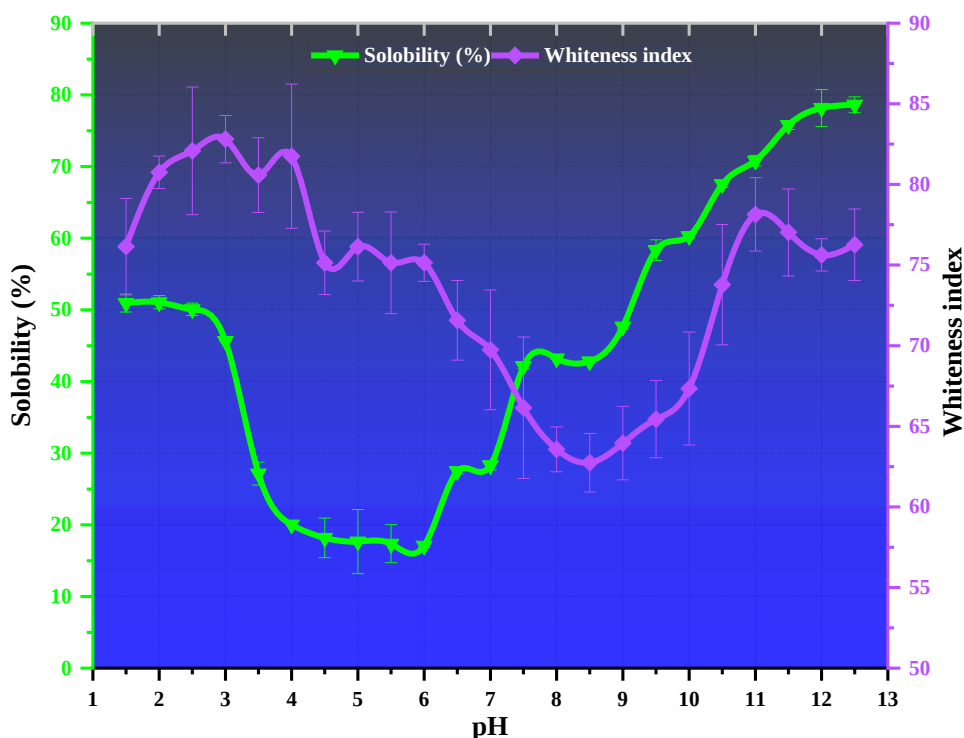
نتایج و بحث

منحنی‌های حلالیت و شاخص سفیدی

نتایج مربوط به ارزیابی مقدماتی درصد حلالیت و شاخص سفیدی پروتئین‌ها بعنوان تابعی از pH های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. طی فرآیند تغییر pH عوامل متعدد (نظیر وجود آنزیم‌های فراوان بویژه هنگام استفاده از ماهی کامل) به موازات pH های لحاظ شده ممکن است بر حلالیت پروتئین‌ها اثرگذار باشند که این مساله پیش‌بینی بهترین pH ها برای انحلال و ترسیب را دشوار و بنابراین ترسیم منحنی درصد حلالیت را الزام آور می‌کند. همانطور که مشخص است بیشترین درصد حلالیت پروتئین در 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٪) و با حرکت به سمت pH های بالاتر روند کاهش تا ۲.۵ (۵۰.۰۸٪) 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 بعنوان نقطه‌ی انتخابی برای ترسیب پروتئین‌ها در مرحله بعدی استفاده شد. با افزایش pH به سمت ناحیه قلیایی حلالیت به طور متناوب افزایش یافت به نحوی که بیشینه میزان حلالیت در pH ۱۲ و ۱۲.۵ (به ترتیب ۷۸.۱۶٪ و ۷۸.۶۲٪) مشاهده شدند. افزایش حلالیت در pH های پایین و بالا به ترتیب مربوط به افزایش بارهای مثبت و منفی پروتئین-های عضله است که سبب ایجاد دافعه الکترواستاتیک بین مولکول‌های پروتئین؛ واکنش بهتر آنها با آب و متعاقباً سبب افزایش مقدار حلالیت می‌شود [35]. 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 [36]. این روند تغییرات حلالیت با مشاهدات حاصل ارزیابی ماهیان کاد و هرینگ [15]؛ ضایعات ماهی هرینگ [16]، گربه ماهی کانال [35] و تیلپیا [36] مطابقت داشت.

طبق آنالیز گراف متعلق به شاخص سفیدی پروتئین‌های استخراج شده در pH های گوناگون؛ پروتئین‌های ناحیه اسیدی در مجموع شرایط بهتری داشتند. در این رابطه بالاترین مقدار شاخص سفیدی در pH ۳ (۸۲.۸۰) مشاهد شد. با حرکت به سمت نواحی میانی طیف به تدریج شاخص سفیدی کاهش یافت. این روند کاهشی 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. بعنوان مثال در بخش آنالیز محتوای رنگدانه‌های هم و ملانین (داده‌ها نمایش داده نشده است) ملاحظه شد این رنگدانه‌ها در پروتئین‌های استخراج شده در pH های قلیایی مجموعاً بالاتر از انواع اسیدی بودند که همین امر می‌تواند عامل بالاتر بودن شاخص سفیدی در پروتئین‌های pH اسیدی استخراج شده باشد. در pH های 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 احتمالا در این pH ها با کاهش میزان بازدهی نسبت ملانین به پروتئین‌ها افزایش پیدا کرده که متعاقبا 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 بویژه ناحیه قلیایی قابل مشاهده است. در مجموع با توجه به نتایج حاصل شده در این بخش؛ pH اسیدی (۲ و ۲.۵) و pH قلیایی (۱۱.۵ و ۱۲) برای انحلال پروتئین‌ها انتخاب شدند. ترسیب پروتئین‌ها نیز همانطور که ذکر شده در pH ۵.۷ صورت گرفت.



شکل ۱. منحنی‌های درصد حلالیت و شاخص سفیدی پروتئین‌های عضله بعنوان تابعی از pH های مختلف.

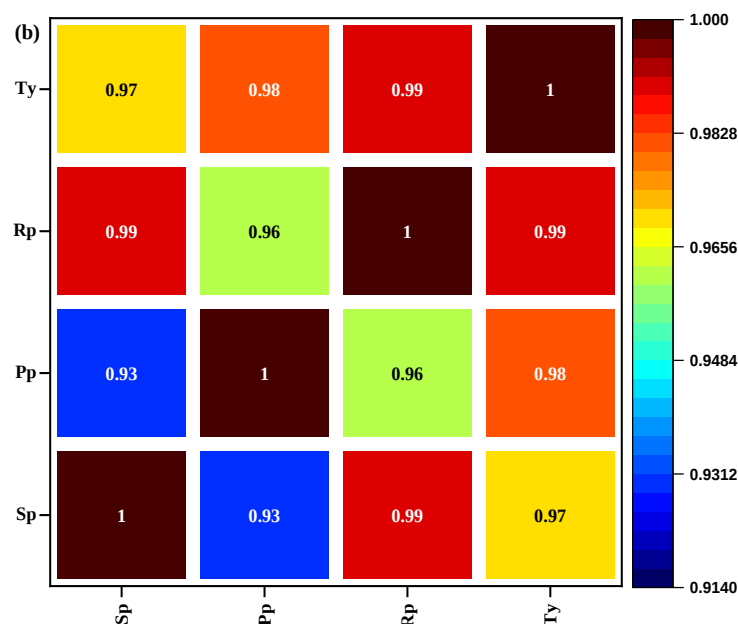
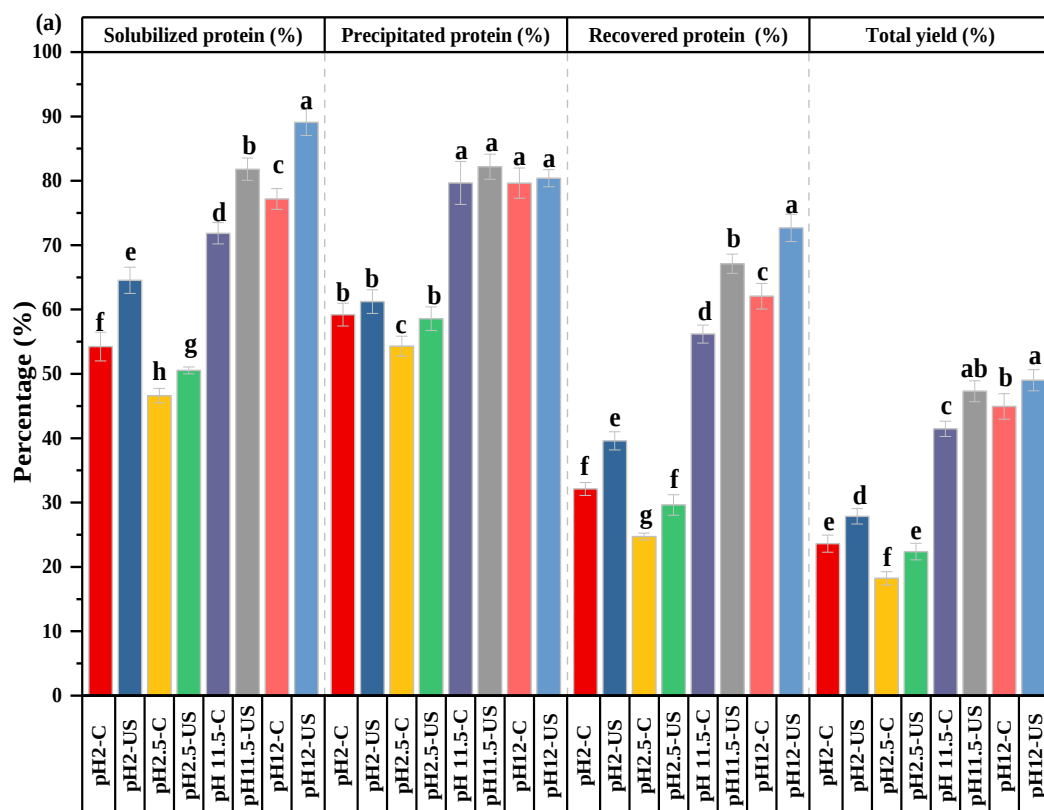
آنالیز توزیع وزنی و درصد بازدهی

چگونگی توزیع وزنی پروتئین‌ها طی فرآیند استخراج و همچنین درصد بازدهی کل در شکل ۲a به تصویر کشیده شده است. همچنین ماتریکس همبستگی پیرسون بین ویژگی‌های سنجیده شده در شکل ۲b قابل مشاهده است. پیش از این اشاره شد سنجش پارامترهایی مانند درصد پروتئین حل شده (SP)، درصد پروتئین رسوب داده شده (PP)، درصد پروتئین بازیابی شده (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 ($P < 0.05$) بطوریکه صرف نظر 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 حل شده در تمامی تیمارها افزایش معنی‌دار نشان داد. این نتایج حکایت از اثر مثبت امواج التراسونیک در آزاد سازی پروتئین‌های زیست‌توده تحت تیمار و انتشار آنها به درون محلول استخراج داشت. گزارش شده است که مقدار حلالیت فاکتور عمده موثر بر بازدهی نهایی استخراج در فرآیند تغییر pH است

(Nolsøe & Undeland, 2009). طبق مشاهدات این پارامتر به نوعی تعیین کننده چگونگی سایر ویژگی‌ها بود بطوریکه نمونه تیمار شده با pH ۱۲ و التراسونیک با بیشترین مقدار از پروتئین حل شده (۸۹.۰۷٪)؛ درصد بالایی از پروتئین رسوب داده شده (۸۰.۴۰٪)، پروتئین بازیابی شده (۷۲.۶۸٪)، و بازده کلی پروتئین (۴۹.۰۱٪) را ارائه کرد. همین سلسله مراتب در سایر تیمارها نیز دیده شد بطوریکه درصد پروتئین حل شده بیشتر؛ منتج به درصدهای بیشتری از پروتئین رسوب داده شده، پروتئین بازیابی شده و بازدهی کلی شد. این پدیده در ماتریکس همبستگی پیروسون متغیرها که در شکل ۲b نمایش داده شده است نیز کاملاً مشهود است. همانطور که ملاحظه می‌شود تمامی متغیرها همبستگی بالای ۰.۹ نشان دادند. نکته جالب توجه در این نتایج؛ همبستگی بالای درصد پروتئین رسوب داده شده با درصد پروتئین حل شده بود بطوریکه طبق نتایج ظاهراً افزایش محتوای پروتئین در محلول بر ترسیب آنها اثر مثبت داشته است.

توانمندی بیشتر pH های قلیایی نسبت به اسیدی در انحلال پروتئین‌ها در تحقیقات مشابه گزارش شده است [13,16,33]. [33] بیشینه انحلال پذیری پروتئین و بازدهی فرآیند ایزولاسیون پروتئین از ضایعات ماهی سالمون، کاد و هرینگ را pH های ۱۲.۵، ۱۲ و ۱۲.۵ گزارش کردند که با نتایج این تحقیق 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 بعنوان مثال گزارش شده است که پروتئین‌های عضله گربه ماهی کانال درصد حلالیت و ریکاوری پروتئین تقریباً برابر در pH های ۲.۵ و ۱۱.۵ نشان دادند [37]. در استخراج پروتئین از عضله تیلپیا شرایط بدین نحو بود که pH های قلیایی (۱۱ و ۱۱.۲) حلالیت بالاتری از اسیدی (۲.۵ و ۲.۹) داشتند اما درصد رسوب پایین‌تری در pH های بین ۵.۱ تا ۵.۷ نشان دادند. همین مساله سبب شده درصد ریکاوری کلی پروتئین‌ها طی فرآیند اسیدی و قلیایی تفاوت چندانی نداشته باشد [36]. اختلاف در نحوه واکنش مواد خام مختلف به pH های 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 فیزیکوشیمیایی فرآیند وابسته است.

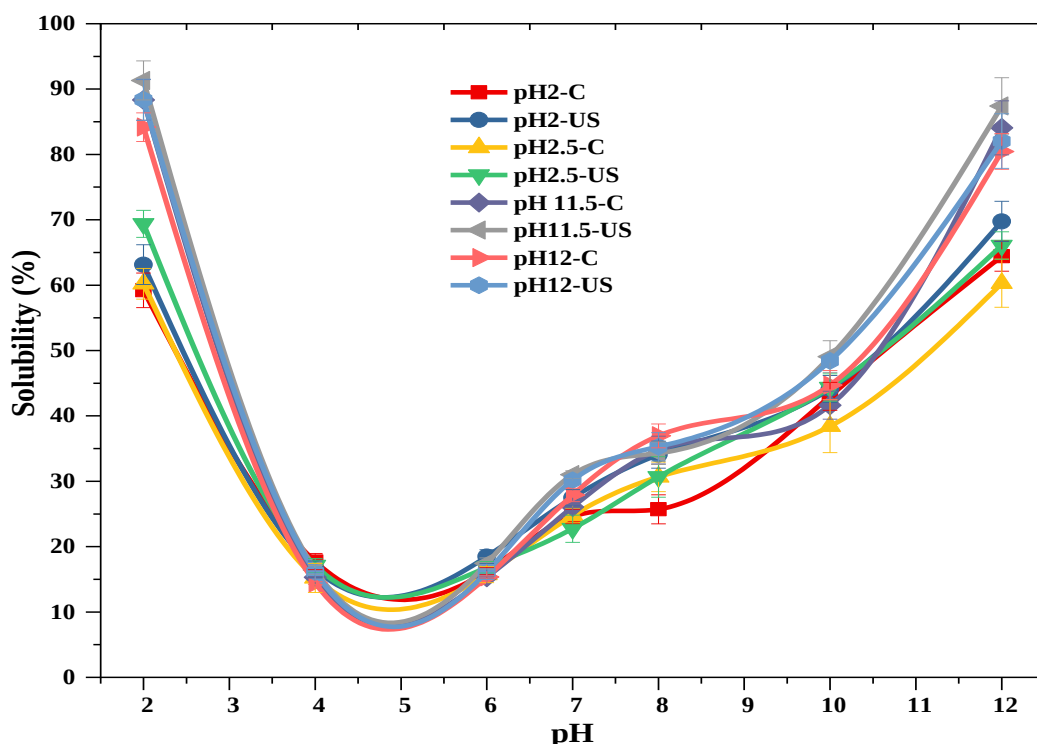
در این کانتکس؛ اثر بخشی امواج التراسونیک بر بهبود رهائش پروتئین‌ها از مواد خام متعدد تحت تیمار از قیل؛ محصولات جنبی فرآوری قزل آلا [13] و ماهی ماکرل کامل [38]؛ به درون محلول استخراج کننده و متعاقباً بهبود درصد بازده کل فرآیند به اثبات رسیده است. التراسونیک سبب بهبود برهمکنش بین محلول استخراج کننده و پروتئین‌ها می‌شود. بدین نحو که انرژی تزریق شده به محلول و پروسه کاویتاسیون متعاقب سبب تخریب بیشتر زیست توده تحت تیمار شده و آزاد سازی پروتئین‌ها به درون محلول را تسهیل می‌کند [38]. بنابراین می‌توان گفت استفاده از التراسونیک بعنوان یک تکنیک سبز؛ قادر است بازدهی فرآیند استخراج پروتئین از منابع دریایی را افزایش دهد. این فرآیند همچنین می‌تواند به اصلاح فاکتورهای فرآیند مثلاً کاهش مصرف آب و مواد شیمیایی کمک کند که در مرحله بهینه سازی به این مبحث پرداخته شده است.



شکل ۲. (a) اثر pH های انحلال و امواج التراسونیک بر درصد پروتئین حل شده، رسوب داده شده، بازیابی شده و بازدهی نهایی استخراج؛ (b) ماتریکس همبستگی پیرسون بین چهار پارامتر ذکر شده. حروف متفاوت در بالای ستون‌های هریکس نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

آنالیز حلالیت در آب ایزوله‌های پروتئین

حلالیت کاربردی ترین مقیاس برای ارزیابی دنا تورا سیون و تجمع؛ و بنابراین یک شاخص عملکردی بسیار مناسب برای پروتئین ها است [39]. حلالیت در واقع یک مشخصه تاثیر گذار بر کار بست پذیری پروتئین ها در سیستم های غذایی است و بر خیلی ویژگی های فانکشنال دیگر پروتئین ها مثل ظرفیت امولسیون کنندگی، کف کنندگی و خواص تشکیل ژل موثر است. همانطور که در شکل ۳. ملاحظه می شود؛ درصد حلالیت ایزوله های پروتئین استخراج شده در شرایط کوناگون در بازه pH ۲ تا ۱۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. همه پروتئین های مورد بررسی در بازه ذکر شده یک روند U شکل نشان دادند بطوری که ماکزیموم میزان حلالیت در pH های شدید اسیدی و قلیایی و مقدار مینیمم آن در حدود pH ایزوالکتریک اتفاق افتاد. در بررسی مقایسه بین پروتئین های ایزوله شده با روش شیفت pH کلاسیک؛ در pH ۲ ایزوله های پروتئین قلیایی اکثرا درصد حلالیت بالاتری نشان دادند و ماکزیموم درصد حلالیت در نمونه pH 11.5-C (۸۸.۳۴٪) مشاهده شد. اعمال التراسونیک سبب افزایش معنی دار حلالیت تمامی نمونه ها در این pH شد و بالاترین مقدار حلالیت در نمونه pH 11.5-US (۹۱.۳۲٪) مشاهده شد. با حرکت به سمت ناحیه ایزوالکتریک سلسه مراتب درصد حلالیت نمونه های پروتئین تا حدی تغییر نشان داد. بدین نحوه که در pH های ۴ و ۶ عموما اختلاف ناچیزی بین ورژن های اسیدی و قلیایی کلاسیک ملاحظه شد اما تکنیک التراسونیک اثر هر چند 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 مقدماتی بررسی شده مطابقت داشت. pH های ۷ و ۸ بعنوان نقاط اصلی در این رابطه مطرح هستند از آنجایی که عملکرد پروتئین ها در سیستم های غذایی بیشتر در این pH ها مورد استفاده قرار می گیرد. پروتئین ایزوله مختلف در pH ۷ درصد حلالیت نسبتا 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 پروتئین های ایزوله شده از ماهیان سالمون، کاد و هرینگ بالاتر بود [15]. در این pH نیز عملکرد نمونه های استخراج شده قلیایی تا حدی بهتر بود و استفاده از التراسونیک سبب بهبود حلالیت در pH های بررسی شده شد. ماکزیموم درصد حلالیت در این نقطه در نمونه pH 11.5-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٪ حلالیت شد و در باقی نمونه ها اثر چندانی نشان نداد. با حرکت به سمت pH های قلیایی درصد حلالیت همه ایزوله های پروتئین افزایش یافت و اثر مثبت بکارگیری التراسونیک در اکثر نمونه های استخراج شده چه اسیدی و قلیایی قبل مشاهده بود. در pH ۱۰ و ۱۱ بیشینه درصد حلالیت پروتئین ها در نمونه pH 11.5-US و به ترتیب به مقادیر ۴۹.۰۸ و ۸۷.۴۲ ملاحظه شد. نمونه های استخراج شده اسیدی چه در حالت کلاسیک و کمک شده با التراسونیک حلالیت کمتری به نسبت هم تایان اسیدی خود ارائه کردند. حلالیت پروتئین ها در آب به عوامل مختلفی از جمله ویژگی های سطحی اسیدهای آمینه، وزن مولکولی، اندازه ذرات و شکل فضایی پروتئین ها بستگی دارد [39,40]. در رابطه با اثر مثبت کلی امواج التراسونیک بر بهبود حلالیت پروتئین ها در آب نتایج مشابهی توسط دیگر محققان گزارش شده است [39,41]. طبق نظر آنها دلیل اصلی این افزایش حلالیت؛ کاهش اندازه ذرات پروتئین و بنابراین تقویت برهمکنش پروتئین-آب به دلیل افزایش سطح در معرض تحت تاثیر امواج التراسونیک بود [39]. یا به عبارتی می توان اضافه کرد نیروی فیزیکی منشا شده از امواج التراسونیک سبب تخریب برهمکنش های درون ساختار تجمع یافته طبیعی پروتئین شده (بعنوان بخشی از فرآیند پروموت کردن دنا تورا سیون) و حلالیت پروتئین ها را تسهیل می کند [41].



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

آنالیز ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی

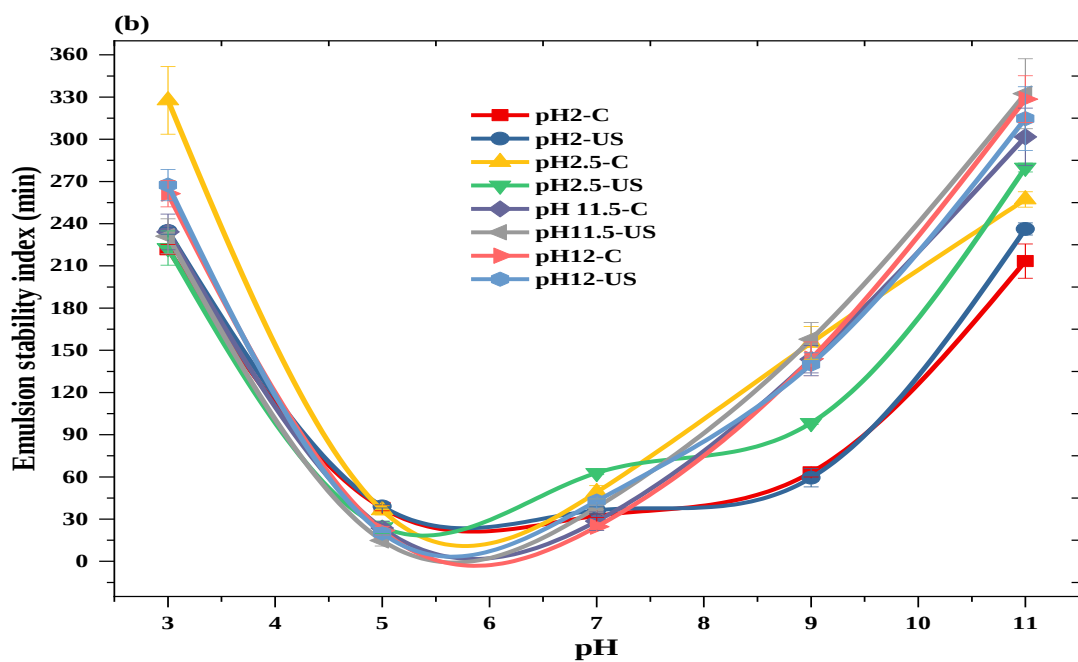
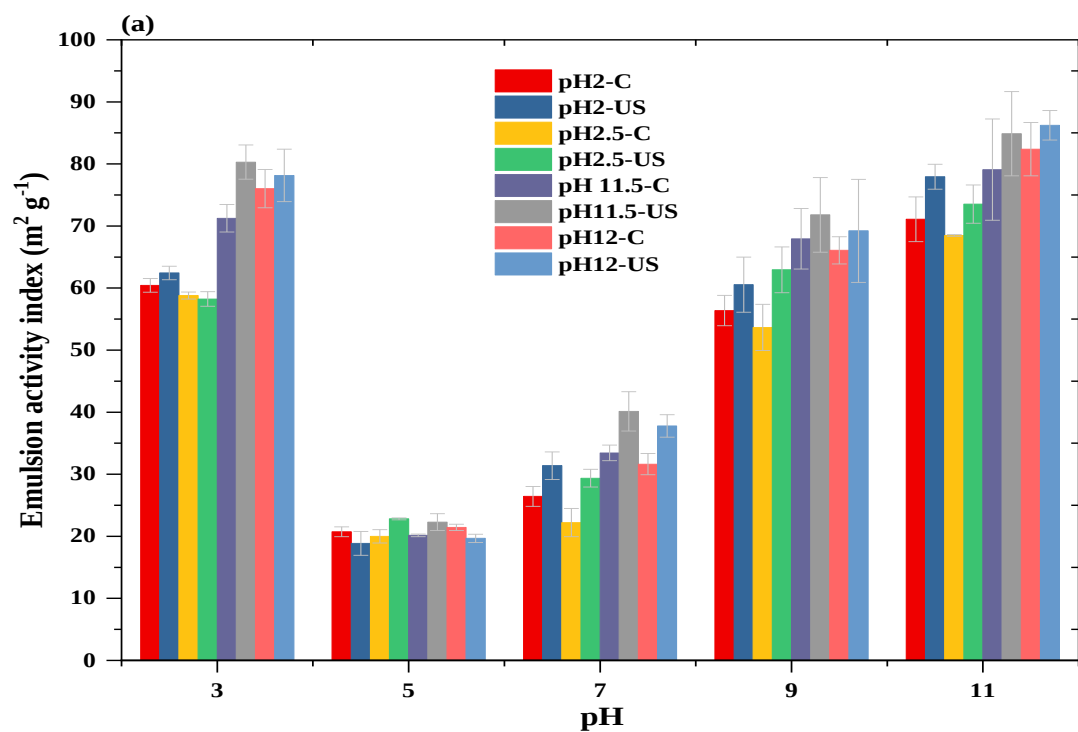
بررسی خواص امولسیون‌کنندگی از منظر تعیین پتانسیل پروتئین‌ها برای کاربرد در رنج وسیعی از محصولات غذایی برپایه امولسیون‌ها حائز اهمیت است. شکل ۴ (a و b) نتایج مرتبط با آنالیز دو ویژگی شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) و پایداری امولسیون (ESI) ایزوله‌های پروتئین مختلف را نشان می‌دهد. pH های ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ برای این منظور انتخاب شدند.

شاخص فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI) نشان‌دهنده توانایی پروتئین‌ها برای جذب شدن در سطح مابین گلبول‌های چربی و فاز آبی طی فرآیند تشکیل امولسیون است [39]. 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 pH های قلیایی شدیدتر بود و در واقع پروتئین‌های ایزوله در pH های قلیایی EAI بالاتری ارائه کردند. این نتایج با مشاهدات عبدالهی و آندلند (۲۰۱۸) در بررسی پروتئین‌های ایزوله شده از ضایعات ماهیان کاد، سالمون و هرینگ مطابقت داشت. مینیمالیتی EAI در pH ۵ قاعدتاً به حلالیت پایین ایزوله‌های پروتئین در pH های 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 (Chen, Zhou, Xu, Zhou, & Liu, 2017).

در حالت مقایسه بین ورژن‌های مختلف فرآیند تغییر pH؛ پروتئین‌های استخراج شده قلیایی ظرفیت امولسیون کنندگی بالاتر از نوع اسیدی نشان دادند؛ احتمالاً به دلیل حمل مقدار بالاتری از بارهای منفی که باز شدن موثرتر پروتئین‌ها و قرارگیری در فضای بین سطحی روغن-آب کمک می‌کند [13]. این اختلاف در pH های دو سر طیف یعنی اسیدی و قلیایی شدید بیشتر و در نواحی میانی طیف مثل pH های ۵ و ۷ کمتر بود. در pH ۷ (بعنوان 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. صرف نظر 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 [15]. 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 بازشدن کامل پروتئین است. بنابراین می‌توان گفت پروتئین‌های از پیش باز شده تولید شده توسط فرآیند تغییر pH بر پروتئین‌های دست نخورده مزیت دارند از آنجایی ساختار سوم آنها از پیش نیمه باز شده است و در مقابل ساختار ثانویه آنها بدون تغییر مانده است [15]. مثلاً در مورد میوزین که تشکیل دهنده بخشی از پروتئین‌های ایزوله‌ها بوده است؛ توصیفات فوق‌الذکر بدین معنی است که سر آن در یک حالت مولتن گلوبولار قرار داشته است (Kristinsson and Hultin 2003). 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 میابد. 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 میابد. همچنین، افزایش آبگریزی سطح و انعطاف پذیری مولکول در حین دناتوره شدن پروتئین منجر به جذب موثرتر مولکول‌های پروتئین در سطح مشترک آب و روغن می‌شود [39]. 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 بطور کلی با مشاهدات حاصل از بررسی درصد حلالیت و هیدروفوبیسته سطح هم راستا بودن به نحوی که نمونه‌های دارای درصد حلالیت و هیدروفوبیسته سطح بیشتر عموماً ظرفیت امولسیون کنندگی بالاتری داشتند. بالاتر بودن هیدروفوبیسته؛ انرژی سد کننده در سطح مشترک روغن-آب را کاهش داده و بنابراین سبب افزایش جذب امولسیفایر می‌شود [16]. در مجموع تکنیک التراسونیک به دلیل ایجاد دناتوراسیون 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 [39]. در مجموع چگونگی جذب اولیه پروتئین‌ها به سطح مشترک و عمل بعنوان یک عامل امولسیون کننده را دو فاکتور تعیین می‌کند؛ نخست حلالیت که سبب دسترسی پروتئین‌ها به سطح مشترک می‌شود و دوم مقدر هیدروفوبیسته که قابلیت تماس

اثر بخش گروه‌های غیر قطبی با فاز روغن را فراهم می‌کند [42]. بنابراین مقدار کمتر EAI در پروتئین‌های ایزوله اسیدی نسبت به قلیایی؛ و همچنین EAI ایزوله‌های پروتئین استخراج شده توسط فرآیند 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 تحقیقات پیشین گزارش شده است [15,39].

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 [39]. در pH ۳؛ ایزوله‌های پروتئین pH2.5-C و pH2-C به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار پایداری را ارائه کردند. نمونه‌های استخراج شده قلیای کلاسیک و کمک شده با التراسونیک مجموعاً در این pH ESI 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 [43]. اگر فرض کنیم سطح حضور پروتئین‌ها در سیستم امولسینی در شکل‌گیری غشای محافظ پایدار تأثر 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 pH های قلیایی نمونه‌های استخراج شده قلیایی کلاسیک و توام با التراسونیک در مجموع ESI بالاتری در مقایسه هم‌تایان اسیدی خود ارائه کردند. ویژگی لایه بین سطحی 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 [44]. اثر مثبت التراسونیک بر بهبود پایداری امولسیون پروتئین‌ها در تحقیقات مشابه تأیید شده است [13,39,45].



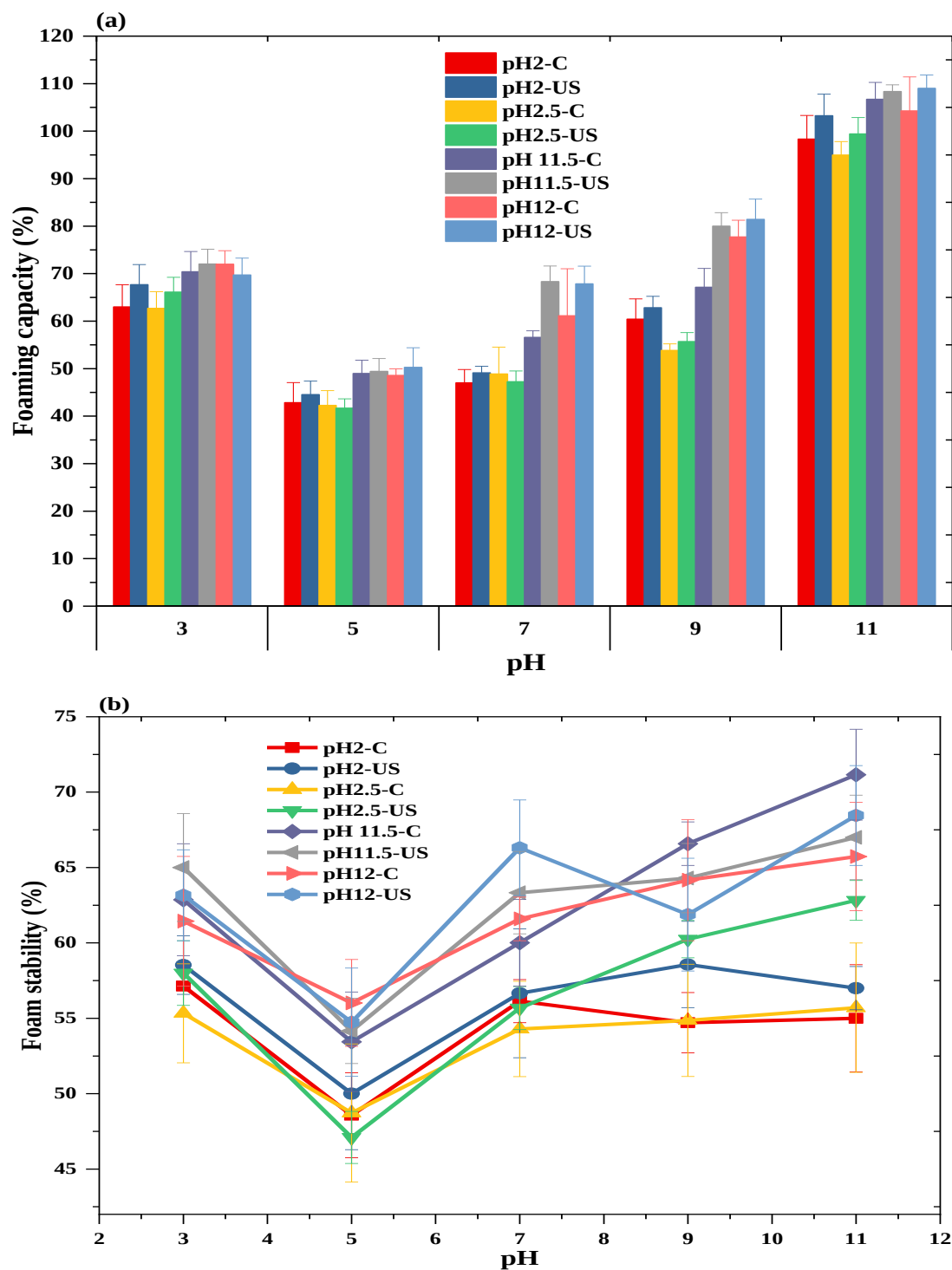
شکل ۴. اثر pH های مختلف بر شاخص های (a) ظرفیت امولسیون کنندگی (EAI) و (b) پایداری امولسیون (ESI) ایزوله های پروتئین استخراج شده توسط ورژن های کلاسیک pH های انحلال ۲ (pH2-C) و ۱۲ (pH12-C) و کمک شده با التراسونیک (pH های انحلال ۲ (pH2-US) و ۱۲ (pH12-US) توام با التراسونیک) فرآیند تغییر pH.

آنالیز ویژگی های کف کنندگی

نتایج حاصل از بررسی دو شاخص ظرفیت کف کنندگی (FC) و پایداری کف (FS) ایزوله های پروتئین مختلف بعنوان تابعی از pH در شکل ۵ (a و b) به تصویر کشیده شده است. ظرفیت کف کنندگی پروتئین ها نیز رفتاری مشابه با دو آنالیز قبل یعنی درصد حلالیت و خواص امولسیون کنندگی نشان داد. رفتار پروتئین ها کاملاً تحت تاثیر pH قرار گرفته و کمینه درصد کف کنندگی در pH ۵ مشاهده شد و با حرکت به سمت نواحی اسیدی و قلیایی بر FC پروتئین ها افزوده شد. پروتئین ها مجموعاً در ناحیه قلیایی و pH ۱۱ FC بالاتری در مقایسه با pH ۳ نشان دادند. نتایجی مشابه با روند مشاهده شده در تحقیق حاضر توسط عبدالهی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است. همچنین پروتئین های استخراج شده قلیایی (ورژن کلاسیک و کمک شده با التراسونیک) در اکثر pH ها FC بالاتری از همتایان اسیدی خود ارائه کردند. پزشک و همکاران (۲۰۲۱) نتایجی همسو با این مشاهدات را در بررسی پروتئین های ایزوله شده از ضایعات ماهی قزل آلا رنگین کمان ارائه کردند. دلیل این پدیده به تجمع بیشتر پروتئین های بازیابی شده با اسید نسبت داده شد که توانایی آنها برای باز شدن در سطح مشترک آب-هوا و متعاقباً تشکیل حباب های کف را محدود میکند. به تعبیر دیگر تغییرات کنفورماسیونی و باز شدگی جزئی بیشتر ساختار در پروتئین های بازیابی شده قلیایی را می توان در این رابطه دخیل دانست. دلیل دیگری که می توان در مورد برتری این درصد FC این نوع از پروتئین ها در مقایسه با همتایان اسیدی ارائه کرد محتوای بالاتر پروتئین آنها است که در آنالیز تقریبی نمونه ها کاملاً مشهود است. طبیعتاً محتوای بالاتر پروتئین (بر مبنای وزن خشک) ارائه شده به سیستم درصد FC را بهبود می دهد. نتایج و استدلالاتی همسو با مطالب عنوان شده توسط دیگر محققان گزارش شده است [15]. در مورد pH های مورد استفاده برای بررسی نیز همین مکانیسم جریان دارد یعنی مثلاً pH ۱۱ سبب افزایش حلالیت پروتئین ها شده و به آنها اجازه می دهد سریعاً به سطح مشترک آب/هوا مهاجرت کرده غشاهای مورد نیاز برای به دام اندازی هوا و تشکیل کف را تشکیل دهند [42]. در pH ۷ ایزوله های 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 پروتئین های قلیایی ایزوله شده از ماهیان کاد (۶۵٪)، سالمون (۵۳٪) و هرینگ (۴۸٪) مشابهت داشت [15]. امواج التراسونیک تقریباً در اکثر pH های بررسی شده بر بهبود FC ایزوله های پروتئین اثر مثبت داشتند که این پدیده با اثر این امواج بر دناتوراسیون جزئی و در واقع اصلاح (باز شدگی) ساختار مولکولی پروتئین ها در ارتباط بود [39]. این باز شدگی ساختار همانطور که ذکر شد توانایی پروتئین ها در گسترده شدن در سطح مشترک آب-هوا و کپسوله کردن هوا را بهبود می دهد؛ بنابراین سبب بهبود FC می شود [46]. برای توضیح بیشتر میتوان گفت فرآیند تشکیل کف شامل دو مرحله اصلی است: (۱) نفوذ پروتئین های حل شده و جذب آنها به سطح مشترک آب-هوا و بنابراین کاهش کشش سطحی و (۲) باز شدگی پروتئین و جهت گیری نواحی هیدروفوب به سمت فاز گازی و نواحی هیدروفیل به سمت فاز مایع برای فرض تشکیلات لوپ و تراپ [47]. بنابر فرآیند دو مرحله ای توضیح داده شده می توان عنوان کرد که نخست پروتئین های استخراج شده قلیایی و در مرحله بعد پروتئین های قلیایی استخراج شده با کمک امواج التراسونیک به دلیل حلالیت، هیدروفوبیسته سطح و انعطاف پذیری ساختاری بالاتر؛ پس از حل شدن سریعتر باز شده، جهت گیری آبدوست/آبگریز کرده و بنابراین درصد FC نسبتاً بهتری ارائه دادند [39,48].

مشابه این نتایج در تحقیقات مرتبط انجام شده گزارش شده است [13,39,48]. 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 تاثیر pH های مختلف تا حدودی با FC تفاوت داشت. البته در اینجا نیز مینیمم درصد FS تقریباً در همه نمونه‌ها در pH ۵ مشاهد 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 تحقیق حاضر بین ۴۷ تا نهایتاً ۷۰ درصد بود که نسبت به نتایج گزارش شده در تحقیق مشابه توسط عبدالهی و آندلند (۲۰۱۸) (بالای ۹۵٪ برای نمونه‌های مختلف پروتئین ماهی) پایین‌تر بود. پروتئین‌های استخراج شده قلیایی مجموعاً در همه pH های تست شده درصد FS بالاتری نشان دادند. استفاده از التراسونیک در pH های ۳، ۷ و ۱۲ تقریباً در همه نمونه‌ها سبب افزایش درصد FS شد. طبق نتایج پزشکی 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 pH های ۲.۵، ۱۱ و ۱۱.۵ سبب بهبود FS شد. بطور کلی پایداری کف‌ها به پایداری فیلم پروتئینی تشکیل شده در فضای مشترک مایع-گاز و همچنین نفوذپذیری این لایه به گاز وابسته است [49]. 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 [50]. این پدیده را می‌توان در آنالیز گروه‌های سولفیدریل فعال و مقدار بالاتر این گروه‌ها در نمونه‌های دارای FS بالاتر ردیابی کرد.



شکل ۵. اثر pH های مختلف بر شاخص های (a) ظرفیت کف کنندگی (FC) و (b) پایداری کف (FS) ایزوله های پروتئین استخراج شده توسط ورژن های کلاسیک (pH های انحلال ۲ (pH2-C) و ۱۲ (pH12-C)) و کمک شده با التراسونیک (pH های انحلال ۲ (pH2-US) و ۱۲ (pH12-US) توام با التراسونیک) فرآیند تغییر pH.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق هدف غایی بر تولید پروتئین ایزوله با کیفیت از نظر خواص تکنو-فانکشنال از فانوس ماهی گونه بنتوسوما پتروتوم بعنوان یک منبع نسبتاً ارزان قرار داده شد. در ابتدا به منظور کشف pH های 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 pH های ذکر شده به شکل کلاسیک و همچنین با کمک امواج التراسونیک انجام گرفتند. طبق نتایج pH های 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 pH های اسیدی و قلیایی شد. ویژگی‌های تکنوفانکشنال ایزوله‌های پروتئین بعنوان تابعی از pH از منظر درصد حلالیت، شاخص‌های ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون و شاخص‌های درصد کف کنندگی و پایداری کف مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع طبق نتایج ایزوله‌های پروتئین قلیایی استخراج شده درصد حلالیت، توان امولسیون سازی و کف کنندگی بالاتری از ورژن اسیدی داشتند. امواج التراسونیک به دلیل پرموت کردن 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 زیست توده مورد استفاده یعنی فانوس ماهیان؛ 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 ارزان برای استفاده در سیستم‌های غذایی بر پایه ژل و امولسیون اثر بخش باشد.

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] [3] 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.
- [4] 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).
- [5] Shaviklo, A. R., & Rafipour, F. (2013). Surimi and surimi seafood from whole ungutted myctophid mince. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 463-468.
- [6] Chai, H. J., Chan, Y. L., Li, T. L., Shiau, C. Y., & Wu, C. J. (2013). Evaluation of lanternfish (*Benthosema pterotum*) hydrolysates as antioxidants against hydrogen peroxide induced oxidative injury. *Food research international*, 54(2), 1409-1418.
- [7] 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 (*Benthosema pterotum*): Antioxidation and safety evaluations for Myctophids protein hydrolysates. *Food Research International*, 46(1), 118-126.
- [8] 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), C304-C312.
- [9] 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.
- [10] 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.
 - [11] 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.
 - [12] 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.
 - [13] 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.
 - [14] 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.
 - [15] 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.
 - [16] 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.
 - [17] 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.
 - [18] 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.
 - [19] 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.
 - [20] 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.
 - [21] 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.

- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food chemistry*, 53(3), 285-293.
- [35] 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), C298-C306.
- [36] 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), E132-E141.

- [37] 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), C298-C306.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] Dalgleish, D. G. (1997). Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in food science & technology*, 8(1), 1-6.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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.

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

Mohsen Kazemi¹; Seyed Mahdi Ojagh^{2*}; Mehdi Abdollahi³; Alireza Alishahi¹

^a Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Faculty of Fisheries and Environmental Science, Department of Seafood Science and Technology, Gorgan, Iran.

2- Corresponding Author, Associate Prof., Dept of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran ,Dept of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. ojagh@ut.ac.ir

³ Chalmers University of Technology, SE 412 96 Gothenburg, Sweden, Department of Biology and Biological Engineering–Food and Nutrition Science.

□ Corresponding author. Tel.: +98 173 2427040; Fax: +98 173 2424155; E-mail address: ojagh@ut.ac.ir

The process so-called pH-shift has emerged as a promising and hopeful method for recovering muscle proteins from complex marine-based raw materials and modifying them. Ultrasonic technique can also be beneficial especially when recovery efficiency is compromised also as a modifier factor of techno-functional features. Bearing these in mind; this study investigated the combined effects of pH-shift and ultrasonic processes on the recovery and functional properties of protein isolates extracted from lanternfish muscle. Solubility and whiteness index curves were primarily plotted to establish optimal pHs for protein solubilization and precipitation. Based on these curves, two acidic pHs (2 and 2.5), two alkaline pHs (11.5 and 12), and pH 5.7 for precipitation were selected. Protein extraction was performed at these pHs using both classical and ultrasound-assisted methods. Alkaline pHs resulted in higher protein solubility and recovery compared to acidic pHs. The highest recovery was observed at pH 12. Ultrasound enhanced protein solubility and recovery at both acidic and alkaline pHs. The highest overall protein recovery was achieved in the alkaline pH-shift versions assisted by ultrasound (pHs 11.5 and 12 with overall recovery yields of 47.31 and 49.01%, respectively). Techno-functional properties of protein isolates were evaluated as a function of pH in terms of solubility, emulsion activity and emulsion stability indexes, and foaming capacity and foam stability indexes. Overall, alkaline protein isolates exhibited higher solubility and greater emulsification and foaming properties than acidic versions. Ultrasound had a positive effect due to promoting conformational changes induced by the pH-shift process. Hence it can be said that utilizing alkaline pH-shift in conjunction with novel extraction techniques like ultrasound can effectively produce relatively high-quality and low-cost protein isolates from lanternfish muscle for use in gel-based and emulsion-based food systems.

Key words: Lanternfish, pH-shift process, Ultrasonic, Techno-functional properties