

Extraction optimization of gel-forming proteins and collagen hydrolysate from whole lanternfish (*Benthosema pterotum*) with a biorefinery approach

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

1. Dept. of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: kazemi_mohsen@yahoo.com
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. E-mail: ojagh@ut.ac.ir
3. Dept. of Life Sciences-Food and Nutrition Science, Chalmers University of Technology, SE 412 96 Gothenburg, Sweden. E-mail: abdollahi.mkh@gmail.com
4. Dept. of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: seafood1144@yahoo.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 01.23.2024

Revised: 02.10.2024

Accepted: 02.22.2024

Keywords:

Gel,
Optimization,
pH-shift,
Protein,
Ultrasonic

ABSTRACT

Here the advantages of employing a biorefinery approach in conjunction with optimization techniques were utilized to attain high overall process efficiency. Initially, an alkaline pH-shift process assisted by ultrasonic and its subsequent optimization were employed to maximize the extraction yield and whiteness index of muscle proteins isolated from lanternfish (*B. pterotum*). The optimal strategy was determined as follows: 6 mL g⁻¹, pH₁ (solubilization) 11.5, 310 W, and pH₂ (precipitation) 5.8 with desirability of 0.84. Collagen hydrolysate was obtained from the connective tissue-containing sediment residue emerging during pH-shift process. The optimal isolated protein (OIP) was utilized to produce heat-set gels in combination with collagen hydrolysate. Breaking force and deformation of the OIP gel were measured at 123 (g) and 10.12 (mm) respectively. Collagen hydrolysate made breaking force (up to 2% w/w) and deformation (up to 10% w/w) improved and had positive effects on color characteristics (especially whiteness index) as well as water holding capacity. Hence, it can be concluded that the integration of a novel extraction technique such as ultrasonic with pH-shift process followed by optimization, as well as concurrent utilization of muscle and connective tissue proteins through a biorefinery approach; provides a significant advancement towards scaling up the extraction process.

Cite this article: Kazemi, Mohsen, Ojagh, Seyed Mahdi, Abdollahi, Mehdi, Alishahi, Alireza. 2024. Extraction optimization of gel-forming proteins and collagen hydrolysate from whole lanternfish (*Benthosema pterotum*) with a biorefinery approach. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (2), 157-175.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2024.22197.1854

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بهینه‌سازی استخراج پروتئین‌های تشکیل‌دهنده ژل و کلاژن هیدرولیز شده از فانوس‌ماهی گونه *Benthoosema pterotum* با یک رویکرد بیوریفاینری

محسن کاظمی^۱، سید مهدی اجاق^{۲*}، مهدی عبدالهی^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، 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. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: seafood1144@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	در این کار از مزایای استفاده هم‌زمان از رویکرد بیوریفاینری و بهینه‌سازی برای دستیابی به کارایی فرآیند کل مطلوب استفاده شد. ابتدا از فرآیند تغییر pH قلبایی کمک شده با التراسونیک و بهینه‌سازی آن به منظور کمک به بیشینه کردن درصد بازدهی استخراج و شاخص سفیدی پروتئین‌های عضله فانوس‌ماهی گونه <i>B. pterotum</i> استفاده شد. استراتژی بهینه انتخاب شده با مشخصات بدین شرح؛ نسبت حلال به جامد 6 ml g^{-1} ، pH انحلال ۱۱/۵، توان التراسونیک ۳۱۰ W و pH ترسیب ۵/۸ و با مطلوبیت ۰/۸۴؛ بازدهی ۵۳ درصد و شاخص سفیدی ۷۶/۸۱ را ارائه کرد. از این پروتئین در ترکیب با کلاژن هیدرولیز شده در تهیه ژل‌های حرارتی استفاده شد. نتایج نشان داد ژل حاصل از پروتئین ایزوله نیروی شکست و تغییر شکل را به ترتیب در حدود ۱۲۳ g و ۱۰/۱۲ میلی‌متر ارائه کرد. افزودن کلاژن هیدرولیز شده سبب بهبود نیروی شکست (تا سطح ۲ درصد وزنی/وزنی) و مقدار تغییر شکل ژل (تا سطح ۱۰ درصد وزنی/وزنی) شد. کلاژن هیدرولیز شده همچنین تا حدودی بر ویژگی‌های رنگ و شاخص سفیدی و همچنین بر ظرفیت نگهداری آب در ژل‌ها اثر مثبت داشت. بنابراین می‌توان عنوان کرد با اتخاذ یک تکنیک جدید استخراج مثل التراسونیک در کنار فرآیند تغییر pH و متعاقباً بهینه‌سازی آن و همچنین استفاده از رویکرد بیوریفاینری به منظور استفاده هم‌زمان از پروتئین‌های عضله و بافت پیوندی موجود در زیست‌توده ماهی؛ می‌توان گامی مهم در جهت حرکت به سمت scale-up (صنعتی کردن مقیاس تولید) کردن فرآیند برداشت.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۳ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۳	
واژه‌های کلیدی: التراسونیک، بهینه‌سازی، پروتئین، تغییر pH، ژل	

استاد: کاظمی، محسن، اجاق، سید مهدی، عبدالهی، مهدی، عالیشاهی، علیرضا (۱۴۰۳). بهینه‌سازی استخراج پروتئین‌های تشکیل‌دهنده ژل و کلاژن هیدرولیز شده از فانوس‌ماهی گونه *Benthoosema pterotum* با یک رویکرد بیوریفاینری. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۳ (۲)، ۱۷۵-۱۵۷.

DOI: 10.22069/japu.2024.22197.1854



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

بر اساس پیش‌بینی‌ها جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۶ میلیارد نفر افزایش خواهد یافت، که سبب ایجاد ضرورت برای افزایش تولید جهانی غذا تا ۶۰ درصد می‌شود (۱). در این رابطه غذاهای دریایی به دلیل کیفیت تغذیه‌ای مناسب، پتانسیل بالایی برای کمک به امنیت جهانی غذا دارند. غذاهای دریایی منابع غنی تغذیه‌ای و به‌ویژه سرشار از پروتئین و اسیدهای چرب امگا-۳ هستند. این غذاها همچنین منبع خوبی از چندین ویتامین و مواد معدنی حیاتی از جمله ویتامین A، ویتامین B₁₂، ویتامین D، کلسیم، ید، سلنیوم و روی می‌باشند (۲). 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 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، ۳). علاوه بر این؛ افزایش تقاضا برای فرآورده‌های حاصل از آبزیان در اثر تبلیغات پیرامون اثر سلامت بخش آن‌ها در سال‌های اخیر و تقاضای مداوم برای منابع جایگزین پروتئین و روغن برای آبی‌پروری به دلیل کاهش عرضه منابع تجاری؛ افزایش توجه روزافزون به استفاده از منابع کم‌مصرف و ارزان‌قیمت دریایی مانند محصولات جنبی برجای‌مانده از خط تولید، ماهیان سطح‌زی کوچک چرب، گونه‌های ناحیه مزوپلاژیک و هم‌چنین منابع حاصل از صید ضمنی را سبب شده است (۱، ۴). یکی از گزینه‌های پیشنهاد شده برای کاهش فشار بر

ذخایر ماهیان تجاری؛ بهره‌برداری از منابع تاکنون بهره‌برداری نشده، ترجیحاً از سطوح تغذیه‌ای پایین‌تر، مانند موجودات ناحیه مزوپلاژیک است (۱). فانوس‌ماهیان فون غالب (تشکیل‌دهنده بالغ بر ۷۰ درصد) از ماهیان ناحیه مزوپلاژیک در جهان هستند. اکثر فانوس‌ماهیان به دلیل وجود مقادیر بالای استر واکس در چربی بدن به‌عنوان غذای انسان قابل استفاده نیستند. در واقع 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 دارای اهمیت جهانی هستند (۵). در این رابطه بررسی‌های سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) به وجود زیست‌توده عظیم و دست‌نخورده از گونه‌های مختلف خانواده فانوس‌ماهیان (Myctophidae) در آب‌های ایرانی دریای عمان اشاره دارد که بخش غالب آن مشتمل بر گونه *Benthosema pterotum* است (۶). *B. pterotum* که به نام کلی فانوس‌ماهی 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 به‌عنوان زیست‌توده غنی از مواد مغذی (منبع خوبی از پروتئین‌ها، چربی‌ها و مواد معدنی) به‌طور سنتی به‌عنوان صید جانبی تلقی شده و اغلب برای تولید پودر ماهی و روغن کم‌ارزش در خوراک دام استفاده می‌شود (۵، ۶، ۷). با این وجود، فانوس‌ماهیان به‌عنوان 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 (۸). 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

را افزایش می‌دهند (۱۹، ۲۰، ۲۱). بهینه‌سازی به ارتقا عملکرد یک سیستم، فرآیند یا محصول باهدف دستیابی به بیش‌ترین فایده از آن اشاره دارد. واژه بهینه‌سازی در شیمی تجزیه معمولاً به‌عنوان یک ابزار برای کشف شرایطی در یک فرآیند است که اعمال آن بهترین پاسخ ممکن را به‌دست می‌دهد (۲۲). روش سطح پاسخ (RSM) یک تکنیک طراحی آزمایش آماری است که برای تجزیه و تحلیل سیستماتیک اثر پارامترهای مستقل (مثل زمان، دما، pH، نسبت مایع به جامد و...) بر پارامترهای وابسته (مثل بازدهی استخراج) و برهمکنش‌های آن‌ها باهدف بهینه‌سازی فرآیندهای پیچیده استفاده می‌شود. مزیت اصلی RSM کاهش تعداد آزمایش‌های عملی مورد نیاز برای مدیریت پارامترهای مختلف و تعامل آن‌ها، تسهیل ترتیب آزمایش‌ها و تفسیر نتایج است (۲۳). بنابر مطالب عنوان شده و همچنین عدم وجود کار پژوهش‌هایی در حوزه استفاده هم‌زمان از فرآیند تغییر pH قلیایی و التراسونیک در استخراج پروتئین از این گونه؛ نخست فرآیند استخراج ترکیبی از طریق روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شد. در مرحله بعد کلاژن هیدرولیز شده با پپسین از باقی‌مانده‌های حاصل از مرحله اول سانترفیوژ فرآیند تغییر pH تهیه شد. در نهایت ژل‌های حرارتی با استفاده از ایزوله پروتئین قلیایی در ترکیب با کلاژن هیدرولیز شده تهیه و خواص بافت، رنگ و ظرفیت نگهداری آب آن‌ها مورد بررسی 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) فانوس‌ماهیان (*B. pterotum*) از کشتی صید ترال کویان در ساحل بندرعباس تهیه شدند. این بلوک‌ها (به‌صورت پوشیده‌شده با یخ خشک) با هواپیما به آزمایشگاه

pH؛ به‌عنوان یک تکنیک نویددهنده و امیدبخش در جهت 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 (۹). این تکنیک از زمان اختراع آن (هالتین و کلر در سال ۱۹۹۹) به‌طور موفقیت‌آمیز برای استخراج پروتئین از مواد خام خاص و پیچیده‌ای از جمله ماهی‌های کوچک سطح‌زی چرب کامل و تخلیه‌شکمی شده (۱۰، ۱۱، ۱۲)، فرآورده‌های جانبی برجای مانده از خط فرآوری انواع ماهیان (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶)، و تخم ماهی (۱۷، ۱۸) مورد استفاده قرار گرفته است. هنگام استفاده از فرآیند تغییر pH، عواملی مانند نوع گونه ماهی، کیفیت مواد خام، ورژن فرآیند (اسیدی یا قلیایی) و استراتژی‌های اصلاحی (در صورت به‌کارگیری) مورد استفاده تأثیرات قابل‌توجه بر بازده استخراج، ترکیب شیمیایی و ویژگی‌های ساختاری دارند که این عوامل در ویژگی‌های عملکردی و ظاهر پروتئین‌ها سبب ایجاد تغییرات می‌شود. 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 به‌طورگسترده مورد ارزیابی قرار گرفته‌است. این روش از اثر کاویتاسیون (جوشش سیال در اثر افت فشار نه افزایش دما) ناشی از تشکیل حفره‌های صوتی در حلال و فروپاشی میکروحباب‌های نامتقارن استفاده می‌کند. این پدیده مقدار زیادی انرژی آزاد کرده و سبب تولید ریزجت‌ها، 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 موبینگی و همچنین کاهش اندازه ذرات کارایی فرآیند و بازدهی استخراج

تکمیل فرآیند رسوب)، با نیروی گریز از مرکز ۸۵۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد تا پروتئین‌های رسوب کرده آبگیری شوند.

در حالت کمک‌شده با امواج التراسونیک؛ پس از مخلوط کردن کردن نمونه‌ها و تنظیم pH؛ همگن‌سازی به مدت ۱۰ دقیقه با امواج فراصوت (۲۰ کیلوهرتز) 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 سلسیوس، سانتریفیوژ و جداسازی لایه میانی؛ پروتئین‌ها با تنظیم pH در ناحیه ایزوالکتریک و سانتریفیوژ متعاقب همان‌طورکه 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 برمبنای رطوبت ۸۰ درصد در پروتئین‌ها) تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. از رابطه ۱ برای محاسبه بازدهی استخراج استفاده شد:

$$TY(\%) = \frac{W \text{ of RPI}(g)}{W \text{ of M}(g)} \times 100 \quad (1)$$

(X_2 ، ۱۰/۵ تا ۱۲/۵)، توان دستگاه التراسونیک (X_3 ، ۱۰۰ تا ۴۰۰ وات) و pH ترسیب (X_4 ، ۴ تا ۶) بر متغیرهای پاسخ شامل بازده کل استخراج (درصد) و شاخص سفیدی با استفاده از روش RSM و توسط نرم‌افزار Design-Expert نسخه ۱۱، تجزیه و تحلیل شدند. محدوده تجربی برای متغیرها براساس

فرآوری آبریان 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.

استخراج پروتئین با روش تغییر pH قلیایی کمک شده با التراسونیک: نمونه‌های ماهی پس از ورود به آزمایشگاه؛ ابتدا با آب آشامیدنی شسته و انجمادزادی شده و سپس با استفاده از یک چرخ گوشت رومیزی چرخ شدند. فرآیند اصلی استخراج طبق روش آندلند و همکاران (۲۴) صورت پذیرفت. ابتدا گوشت چرخ‌شده ماهی با آب مقطر سرد 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 (۲/۰ و ۲ نرمال) در نقطه مدنظر تعیین شد. پس از نگهداری به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس؛ نمونه‌ها در سانتریفیوژ از پیش‌سرد شده (۴ درجه سلسیوس) (Eppendorf 5810R Refrigerated) (Centrifuge) به مدت ۲۰ دقیقه با نیروی گریز از مرکز ۸۵۰۰g سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، pH نمونه‌ها در pH ایزوالکتریک تنظیم شدند و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس (باهدف

* وزن‌های (W) گوشت چرخ‌شده (M) و ایزوله‌های پروتئینی استخراج‌شده (RPI) در سطح رطوبت برابر. **بهینه‌سازی فرآیند تغییر pH قلیایی کمک‌شده با امواج التراسونیک:** برای تعیین شرایط بهینه فرآیند استخراج؛ اثر چهار متغیر مستقل شامل نسبت مایع به جامد (X_1 ، ۵ تا ۸ میلی‌لیتر بر گرم)، pH انحلال

چندجمله‌ای درجه دوم (معادله ۲) اصلاح شده (براساس تأثیر رگسورها بر شاخص‌های بسندگی مدل) برازش شدند تا یک رابطه بین آن‌ها به شرح زیر برقرار شود:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j=1}^4 \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

در pH ۲ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت انجام شد. pH محلول واکنش به‌طور مرتب چک شد و در صورت لزوم با افزودن ۱ مولار در سطح ۲ ثابت نگه‌داشته شد. در پایان واکنش هیدرولیز با حرارت دادن مخلوط در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه متوقف شده و در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی مخلوط آب و یخ سرد شد. محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت حاوی کلاژن هیدرولیز شده خشک انجمادی شده و در دمای منفی ۲۰ ذخیره‌سازی شد. میزان درجه هیدرولیز در طول فرآیند و قبل از خشک کردن و درصد بازدهی پس خشک کردن کلاژن هیدرولیز شده به روش عبدالهی و همکاران (۲۵) محاسبه شدند.

آماده‌سازی ژل: جهت تهیه ژل برپایه ایزوله پروتئین از روش چایجان و همکاران (۲۶) استفاده شد. ابتدا نمونه‌های منجمد به مدت ۷ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس انجمادزایی شدند. درگام بعد نمونه‌ها به قطعات کوچک ریز شده؛ در یک همزن مولینکس (Moulinex, France) برای مدت ۱ دقیقه مخلوط شده؛ و سپس رطوبت آن‌ها از طریق افزودن یخ در حال ذوب شدن به ۸۰ درصد رسانده شد. به‌منظور انحلال پروتئین؛ میزان ۲ درصد نمک اضافه و همزدن به مدت ۲ دقیقه ادامه یافت. سپس نمونه‌ها به درون

ارزیابی‌های پیشین تعیین شد. طرح باکس- بنکن دیزاین (Box-Behnken (BBD)) در سه سطح و با ترتیب تصادفی برای بهینه‌سازی شرایط استخراج اجرا شد. برطبق نتایج حاصل از آزمایش‌های عملی، متغیرهای مستقل و پاسخ توسط یک مدل

در اینجا، Y متغیر پاسخ پیش‌بینی شده توسط مدل است، X_i و X_j متغیرهای مستقل را نشان می‌دهند و β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب ضرایب رگرسیون رگسورهای ثابت، خطی، درجه دوم و برهمکنش هستند.

تهیه کلاژن هیدرولیز شده از باقی‌مانده‌های فرآیند تغییر pH: باقی‌مانده فرآیند تغییر pH فانوس‌ماهی حاوی استخوان، پوست، بافت پیوندی و سایر ترکیبات غیرمحلول طبق روش (۲۵) تحت فرآیند استخراج کلاژن هیدرولیز شده قرار گرفتند. باهدف حذف پروتئین‌های غیرکلاژنه؛ باقی‌مانده‌ها ابتدا در محلول ۰/۱ نرمال NaOH با نسبت ۱ به ۶ غوطه‌ور شده و به مدت ۶ ساعت هم‌زده شدند (محلول هر ۳ ساعت تعویض شد). باقیمانده‌ی تیمار شده تا رسیدن به pH خنثی با آب سرد شسته شده و سپس جهت حذف مواد معدنی؛ به مدت ۴۸ ساعت در محلول ۰/۵ مولار EDTA با pH ۷/۴ با نسبت ۱ به ۱۰ (وزن به حجم) غوطه‌ور و تحت شرایط هم‌زدن مداوم قرار گرفت. محلول EDTA هر ۱۲ ساعت یکبار تعویض شد. در پایان محتوای پروتئین باقی‌مانده‌ها ارزیابی شد.

در مرحله بعد باقی‌مانده‌ها آب دیونیزه با نسبت ۱ به ۵ (باقی‌مانده: آب) ترکیب شده و فرآیند هیدرولیز با افزودن پیپسین (۱ درصد وزنی بر مبنای پروتئین)

یافت. در نهایت از سول حاصل جهت تهیه ژل مطابق روش توضیح داده شده در بالا از طریق پخت یک مرحله‌ای در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد.

سنجش رنگ ژل: شاخص‌های رنگ سطحی نمونه‌های پروتئین به وسیله یک دستگاه رنگ‌سنج (کالریمتر) (BYK Gardner, USA) ارزیابی شدند. مقادیر روشنایی (L^*)، سبز-قرمزی (a^*) و آبی-زردی (b^*) بر اساس سیستم فضای رنگی CIELAB ثبت شدند. شاخص‌های موردنظر در سه نقطه از ژل سنجش و شاخص سفیدی به کمک رابطه ۳ محاسبه گردید.

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (3)$$

آزمون از یخچال خارج و به صورت سیلندری شکل با ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متر آماده‌سازی شدند. انجام آزمون TPA با پروب مسطح به قطر ۴۰ میلی‌متر انجام شد که طی آن ژل در دو مرحله با سرعت ۶۰ میلی‌متر در دقیقه به میزان ۵۰ درصد ارتفاع اولیه فشرده گردید. به کمک نتایج حاصل از این بخش؛ شاخص استحکام ژل محاسبه و گزارش گردید. جهت محاسبه قدرت ژلی؛ نمونه‌های ژل با قطر و ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متر استفاده شد. در این رابطه آزمون نفوذ جهت سنجش نیروی شکست و میزان تغییر شکل نمونه‌ها به کمک یک پروب کروی به قطر ۵ میلی‌متر تا نقطه شکست ژل‌ها انجام شد. این تست سرعت حرکت پروب ۶۰ میلی‌متر در دقیقه تنظیم شده و حداکثر نیرو در لحظه نفوذ به عنوان نیروی شکست (گرم) و میزان تغییر ارتفاع به عنوان شاخص تغییر شکل (میلی‌متر) در نظر گرفته شد.

لوله‌های استیل ضد زنگ با قطر ۱/۵ سانتی وارد و دو طرف آن‌ها محکم بسته و درزبندی شد. پس از پخت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه (تهیه ژل حرارتی تک مرحله‌ای)؛ فرآیند پخت با انتقال سریع استوانه‌ها به ظرف حاوی یخ انجام شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در یخ نمونه‌ها خارج و با هدف آماده‌سازی مقدم بر انجام آنالیزها؛ ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

به منظور بررسی اثر افزودن کلاژن هیدرولیز شده بر ژل تولیدی؛ پس از طی مراحل انجمادزدایی، خرد کردن، تنظیم رطوبت و افزودن نمک؛ پودر کلاژن هیدرولیز شده (از قبل به رطوبت ۸۰ درصد رسانده شده) به سول پروتئینی حاوی رطوبت ۸۰ درصد اضافه شده و فرآیند با ۵ دقیقه مخلوط کردن ادامه

سنجش ظرفیت نگهداری آب ژل: ظرفیت نگهداری آب مطابق روش کاردوسو و همکاران (۲۷) اندازه‌گیری شد. نمونه ریز شده ژل (۲ گرم) در دو لایه کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (وزن شده) پیچیده و در یک لوله سانتریفیوژ قرار داده شد. در گام بعدی نمونه با سرعت ۳۰۰۰ g برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ نمونه جدا شده و کاغذ صافی مجدداً توزین شد. در نهایت ظرفیت نگهداری آب محاسبه شده و برحسب گرم آب در نمونه پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰ گرم آب اولیه موجود در نمونه بیان گردید.

تجزیه تحلیل پروفایل بافت: خواص بافتی ژل‌های تولید شده به کمک دستگاه آنالیز بافت (Swiss,) (TexVol) و از طریق انجام آزمون تجزیه و تحلیل پروفیل بافت (TPA) در دمای محیط ارزیابی گردید. به همین منظور نمونه‌های ژل دو ساعت قبل از انجام

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 چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

برازش مدل درجه دوم و تحلیل واریانس: این مرحله باهدف بهینه‌سازی فرآیند تغییر pH قلیایی کمک شده با تکنیک التراسونیک صورت گرفت. در مجموع ۳۰ حالت مختلف آزمایشی به‌صورت عملی انجام شد و نتایج به‌دست‌آمده برای درصد بازدهی استخراج کل و شاخص سفیدی در نرم‌افزار وارد شد.

تحت تأثیر استراتژی‌های مختلف، بازده استخراج پروتئین از ۳۶/۷۶ تا ۵۵/۱۳ درصد متغیر بود. رنج تغییرات برای شاخص سفیدی بین ۶۶/۷۳ تا ۷۸/۳۸ قرار داشت. در مرحله بعد نتایج تجزیه و تحلیل شد و مدل پیش‌بینی‌کننده درجه دوم براساس تحلیل رگرسیون خطی چندگانه به‌دست آمد. لازم به ذکر است که از مدل اصلاح شده بر مبنای اثرات رگرورها بر شاخص‌های توان و بسندگی مدل شامل R^2 ، Adjusted R^2 و Predicted R^2 استفاده شد. برای تعیین ضرایب رگرسیون از روش حداقل مربعات استفاده شد. معادله‌های چندجمله‌ای مرتبه دوم شماره ۴ و ۵ به‌عنوان بهترین مدل‌های فیت‌کننده به شرح زیر به‌ترتیب برای پاسخ‌های درصد بازدهی کل و شاخص سفیدی انتخاب شدند:

$$Y = 47.21 + 1.22X_1 + 4.37X_2 - 2.18X_3 + 5.15X_4 - 1.40X_1X_3 - 1.58X_2^2 - 1.69X_3^2 \quad (4)$$

(۵)

$$Y = 76.36 + 1.11X_1 - 0.09X_2 - 1.29X_3 + 3.10X_4 - 1.43X_1X_3 - 2.69X_3X_4 - 1.38X_1^2 - 2.89X_2^2 - 1.09X_3^2 - 1.76X_4^2$$

برای پاسخ درصد بازدهی کل نمرات بهتری از شاخص سفیدی نشان دادند اما در مجموع این نمرات برای هردو پاسخ در سطح قابل قبول قرار داشتند. نتایج مرتبط با سطح معنی‌داری ترم‌های رگرسیون نیز در جدول ۱ قابل مشاهده است. باهدف دستیابی به ساده‌ترین مدل سعی شد از رگرورهای فاقد اثر معنی‌دار صرف‌نظر شود مگر در صورت اثبات اثر مثبت آن‌ها بر شاخص‌های توان و بسندگی مدل. در رابطه با درصد بازدهی کل؛ اثر تمام رگرورهای اصلی در مدل معنی‌دار بود. عوامل برهمکنش هیچ‌کدام اثر معنی‌دار در مدل نشان ندادند اما رگرور X_1X_3 به‌دلیل اثر آن در بهبود توان مدل در پیش‌بینی متغیر پاسخ حفظ شد. از رگرورهای توان دوم فقط X_2 و X_3 اثر معنی‌دار نشان دادند. در متغیر پاسخ شاخص سفیدی همه رگرورهای اصلی به‌غیر از X_2

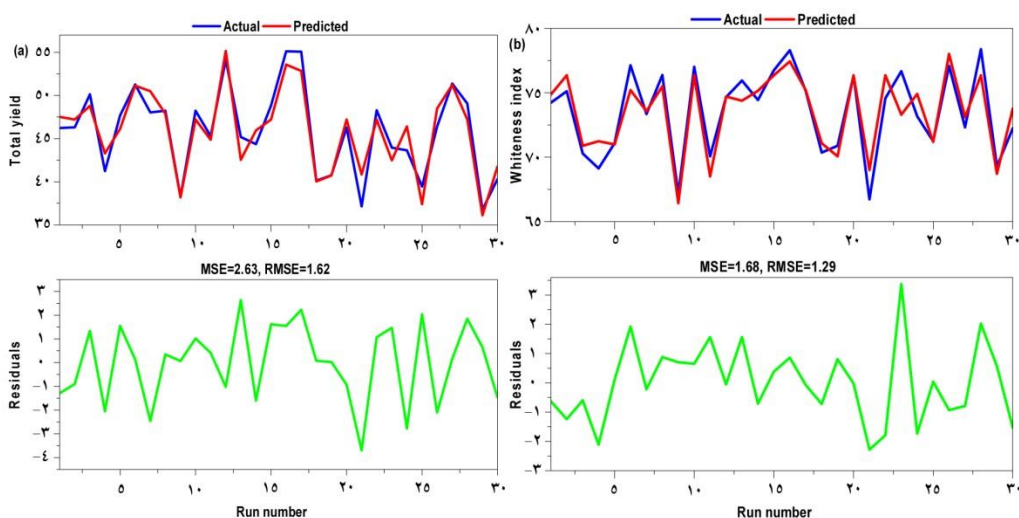
نتایج آنالیز واریانس مدل و رگرورها و همچنین شاخص‌های توان و بسندگی مدل شامل R^2 ، Adjusted R^2 و Predicted R^2 در جدول ۱ ارائه شده است. توانایی مدل‌ها در پیش‌بینی داده‌های پاسخ، میزان خطا در پیشگویی هر پاسخ و همچنین شاخص‌های MSE و RMSE در شکل ۱ a و b ارائه شده است. با توجه به نتایج؛ توابع مدل برازش شده برای هر دو ویژگی پاسخ p-value بسیار پایین ($p\text{-value} < 0.0001$) ارائه کردند که نشان‌دهنده معنی‌داری مدل در سطح ۹۹ درصد است. شاخص Lack of fit برای هر دو مدل معنی‌دار نبود. میزان خطا (اختلاف داده‌های واقعی از پیش‌بینی‌شده) در درصد بازدهی کل کم‌تر بود و همین امر سبب شد این متغیر شاخص MSE کم‌تری از شاخص سفیدی ارائه دهد. سه شاخص R^2 ، Adjusted R^2 و Predicted R^2

اثر معنی‌دار ارائه کردند. در حالت برهمکنش دو رگرسیون X_3X_4 و X_1X_3 در مدل حفظ شدند (به ترتیب رگرسیون اول فاقد اثر معنی‌دار و دومی اثری معنی‌دار بود).

جدول ۱- نتایج حاصل از آنالیز واریانس برای بهترین مدل‌های برازش درصد بازدهی کل و شاخص سفیدی و هم‌چنین شاخص‌های توان و بسندگی مدل.

شاخص سفیدی		بازدهی کل		منبع	رگرسیون / مدل
P-value*	F-value	P-value*	F-value		
< ۰/۰۰۰۱*	۹/۸۸	< ۰/۰۰۰۱*	۲۶/۴۵		مدل
۰/۰۲۹۲*	۵/۵۶	۰/۰۳۶۵*	۴/۹۶	X_1	اصلی
۰/۸۳۵۵	۰/۰۴۴۳	< ۰/۰۰۰۱*	۶۳/۸۹	X_2	
۰/۰۱۳۲*	۷/۴۷	۰/۰۰۰۶*	۱۵/۹۴	X_3	
< ۰/۰۰۰۱*	۴۳/۳۲	< ۰/۰۰۰۱*	۸۸/۶۶	X_4	
۰/۰۹۶۱	۳/۰۶	۰/۱۵۳۶	۲/۱۸	$X_1 X_3$	برهمکنش
۰/۰۰۳۸*	۱۰/۸۷			$X_3 X_4$	
۰/۰۳۹۷*	۴/۸۸			X_1^2	توان دوم
۰/۰۰۰۲*	۲۱/۵۳	۰/۰۳۷۱*	۴/۹۲	X_2^2	
۰/۰۹۶۳	۳/۰۶	۰/۰۲۶۴*	۵/۶۷	X_3^2	
۰/۰۱۰۸*	۷/۹۸			X_4^2	
۰/۳۲۵۸	۱/۵۷	۰/۱۳۲۲	۲/۷۷		Lack of Fit
۰/۸۳۸۷		۰/۸۹۳۸			R^2
۰/۷۵۳۸		۰/۸۶۰۰			Adj. R^2
۰/۵۹۲۶		۰/۷۹۴۷			Pred. R^2

* معنی‌دار ($P < 0/05$)؛ غیر معنی‌دار ($P > 0/05$)



شکل ۱- گراف‌های حاصل از ترسیم داده‌های واقعی در مقابل داده‌های پیش‌بینی شده توسط مدل رگرسیونی و خط‌های پیش‌بینی در هر نمونه برای متغیر پاسخ (a) درصد بازده کل و (b) شاخص سفیدی.

آنالیز روابط مابین متغیرهای مستقل و پاسخ: به منظور درک بهتر اثرات اصلی و برهمکنش متغیرهای مستقل (نسبت مایع به جامد، pH انحلال، توان اولتراسونیک، pH ترسیب) بر راندمان استخراج و شاخص سفیدی؛ نمودارهای نشان‌دهنده اثر تکی رگرسورهای اصلی و همچنین نمودارهای کانئور رگرسورهای برهمکنش لحاظ شده در مدل توسط Design-Expert 11 ترسیم و در شکل ۲ ارائه شده است.

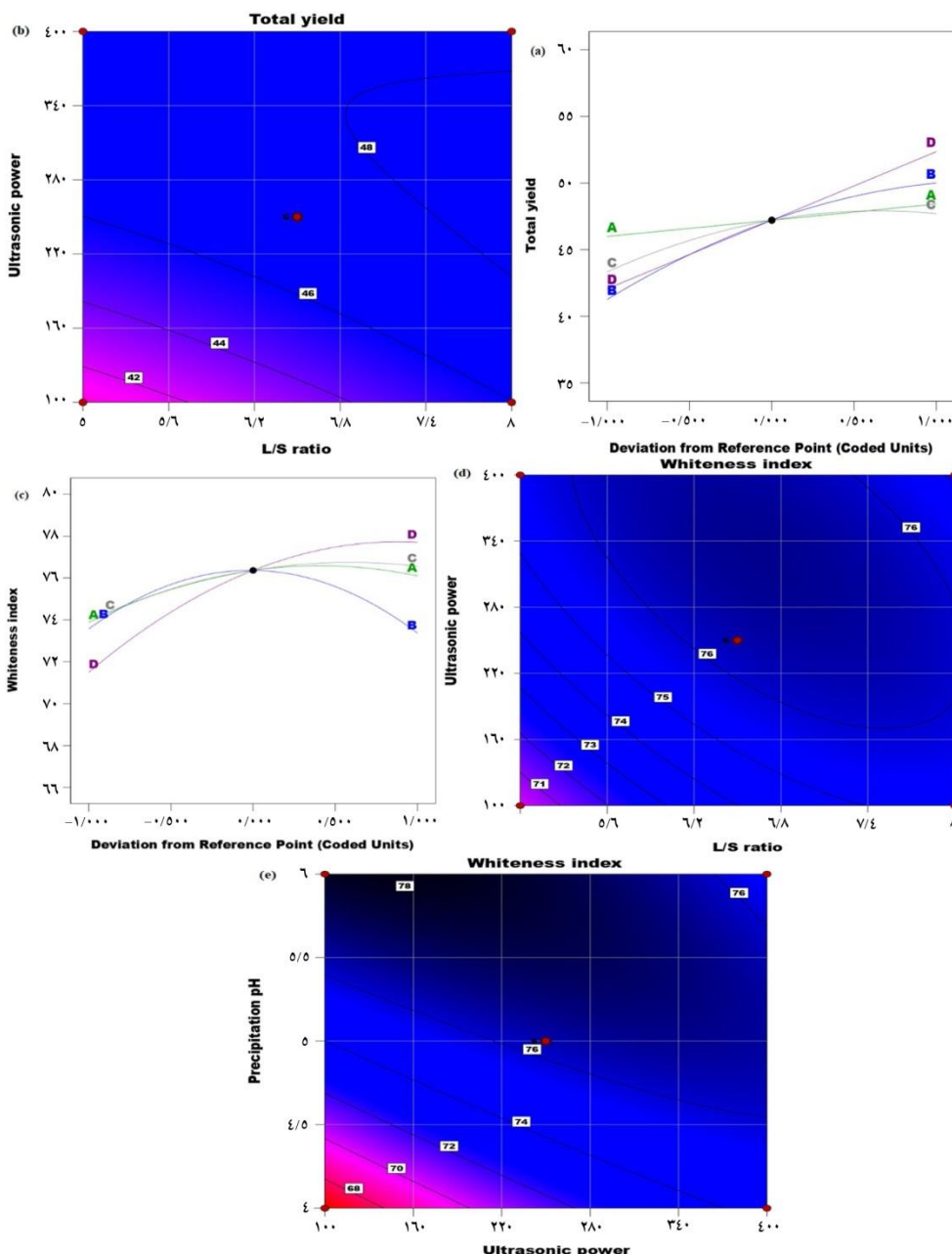
در تصویر نشان‌دهنده اثر تک‌تک متغیرهای مستقل بر درصد بازدهی کل (شکل ۲ a)؛ با افزایش نسبت مایع به جامد (ویژگی A) از ۶ تا ۸، میزان بازدهی کل با یک شیب ملایم و در حدود ۳ درصد افزایش نشان داد. حفظ ویسکوزیته مناسب در حلال استخراج‌کننده در طول فرآیند استخراج ضروری است (۲۸). بنابراین می‌توان گفت نسبت ۸ میلی‌لیتر بر گرم به‌نحوی شرایط مناسب‌تر را در این زمینه فراهم کرده‌است. افزایش pH انحلال (ویژگی B) از ۱۰/۵ به ۱۲/۵ نیز سبب بهبود راندمان استخراج تا حدود ۹ درصد شد. افزایش حلالیت در pHهای بالا مربوط به افزایش بارهای منفی پروتئین‌های عضله است که سبب ایجاد دافعه الکترواستاتیک بین مولکول‌های پروتئین؛ واکنش بهتر آن‌ها با آب و متعاقباً سبب افزایش مقدار حلالیت و متعاقباً بازدهی می‌شود (۲۹). بیش‌ترین میزان اثربخشی توان التراسونیک (ویژگی C) در بازه ۱۰۰ تا ۳۰۰ مشاهده شد که سبب بهبود حدوداً ۴ درصدی بازده کل شد اما بعد از ۳۰۰ وات راندمان استخراج ثابت ماند. امواج اولتراسونیک با ایجاد شدت کاویتاسیون بالا، جریان‌دهی و میکروجت، منجر به تخریب بافت مواد تحت تیمار می‌شوند. این پدیده نفوذ حلال را به توده تحت تیمار تسهیل کرده و

بنابراین انتقال جرم را افزایش می‌دهد که به‌طور منطقی سبب افزایش راندمان استخراج می‌شود (۳۰، ۳۱). pH ترسیب (ویژگی D) راندمان استخراج را عمیقاً تحت‌تأثیر قرار داد به‌نحوی که با حرکت در بازه ۴ تا ۶ راندمان استخراج افزایش حدوداً ۱۰ درصد نشان داد. 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 در نتیجه تجمع و کاهش حلالیت پروتئین‌ها را سبب می‌شود (۳۲). بهترین pH برای ترسیب پروتئین‌ها بسته نوع گونه، ماهیت پروتئین‌ها و حالت کنفورماسیونی آن‌ها متفاوت است و بنابراین فرآیند بهینه‌سازی جهت یافتن این pH خاص مفید است. نحوه اثر متقابل دو متغیر نسبت مایع به جامد (X_1) با توان التراسونیک (X_3) (شکل ۲ b) از اثر تکی آن‌ها پیروی کرد به‌نحوی که با افزایش توان تا حدود ۳۰۰ و نسبت مایع به جامد تا ۸ بالاترین مقدار راندمان به‌دست آمد.

در تصویر متعلق به اثر تکی متغیرهای مستقل بر شاخص سفیدی (شکل ۲ c)؛ همان‌طور که مشاهده می‌شود ارتقا متغیر مایع به جامد از ۵ تا ۷ سبب بهبود این شاخص شد اما در ادامه بازه این شاخص ثابت ماند. افزایش pH انحلال از ۱۰/۵ تا ۱۱/۵ سبب بهبود شاخص سفیدی شد اما در ادامه و تا pH ۱۲/۵ روند متغیر پاسخ نزولی شد. با بیش‌تر شدن توان دستگاه (تا حدود ۳۰۰) نیز شاخص سفیدی بیش‌تر شد. متغیر pH ترسیب نیز با شاخص سفیدی رابطه مثبت معنی‌دار نشان داد به گونه‌ای که با افزایش pH از ۴ به ۶ مقدار سفیدی ارتقا پیدا کرد. دلیل این اختلافات را می‌توان به عواملی مثل اختلاف در نوع رنگدانه‌های

نمودارهای کانتور نشان‌دهنده اثرات متقابل نسبت مایع به جامد (X_1) با توان التراسونیک (X_3) (شکل ۲ d) و همچنین توان التراسونیک (X_3) با pH ترسیب (X_4) (شکل ۲ e) تقریباً همان حالت ذکر شده برای اثرات تکی را نشان دادند.

موجود و محتوای آن‌ها، شرایط شیمیایی رنگدانه (مثلاً اکسیداسیون رنگدانه‌های هم) و خواص عملکردی مثل ظرفیت نگهداری آب نسبت داد. این اختلافات قاعدتاً تحت تأثیر استراتژی‌های به‌کار گرفته شده برای استخراج پروتئین‌ها ایجاد شدند. روند تغییرات در



شکل ۲- نمودارهای نشان‌دهنده اثر متغیرهای مستقل به شکل تک شامل نسبت مایع به جامد (A)، pH انحلال (B)، توان دستگاه التراسونیک (C) و pH ترسیب (D) و نمودارهای کانتور رگرسیون‌های بهمکنش حفظ شده در مدل بر متغیرهای پاسخ درصد بازدهی کل (a و b) و شاخص سفیدی (c تا e).

بهینه‌سازی نهایی و تأیید مدل: پس از ورود داده‌های پاسخ به ماتریس طراحی آزمایش و انجام تجزیه و تحلیل، نوبت به مرحله بهینه‌سازی نهایی به‌منظور تعیین شرایط بهینه استخراج، پیش‌بینی متغیر پاسخ و مقایسه آن با مقدار واقعی رسید. بر این اساس معیارهای موردنظر برای تمامی پارامترهای مستقل و وابسته تعیین و سپس بهینه‌سازی انجام شد. نحوه تعیین معیارها؛ بسته به اهداف پژوهش و اهمیت هر پارامتر و همچنین دیدگاه پژوهش‌گران مختلف است. در این پژوهش هدف این بود در عین بیشینه کردن درصد بازدهی و میزان سفیدی محصول، در مصرف آب و میزان مواد شیمیایی تا حد امکان صرفه‌جویی کرد. بنابراین درصد مایع به جامد در حالت بین ۵ تا ۶ و pH حلالیت بین ۱۰/۵ تا ۱۱/۵ تنظیم شد. دو متغیر توان التراسونیک و pH ترسیب در رنج اولیه حفظ شدند. دو متغیر درصد بازدهی کل و شاخص سفیدی نیز در حالت ماکزیمم تنظیم شدند. استراتژی انتخاب شده با این ویژگی‌ها، ۶ میلی‌لیتر بر گرم، pH انحلال ۱۱/۵، و ۳۱۰ وات؛ و pH ترسیب ۵/۸ و با مطلوبیت ۰/۸۴؛ بازدهی بیشینه را ۵۳ درصد و شاخص سفیدی ۷۶/۸۱ ارائه کرد. در آزمایش‌های عملی برای تأیید بسندگی مدل، ایزوله پروتئین طبق شرایط بهینه تعیین‌شده و با سه تکرار استخراج شد و بازده حدوداً $54 \pm 1/47$ درصد و شاخص سفیدی $74/39 \pm 2/12$ محاسبه شد.

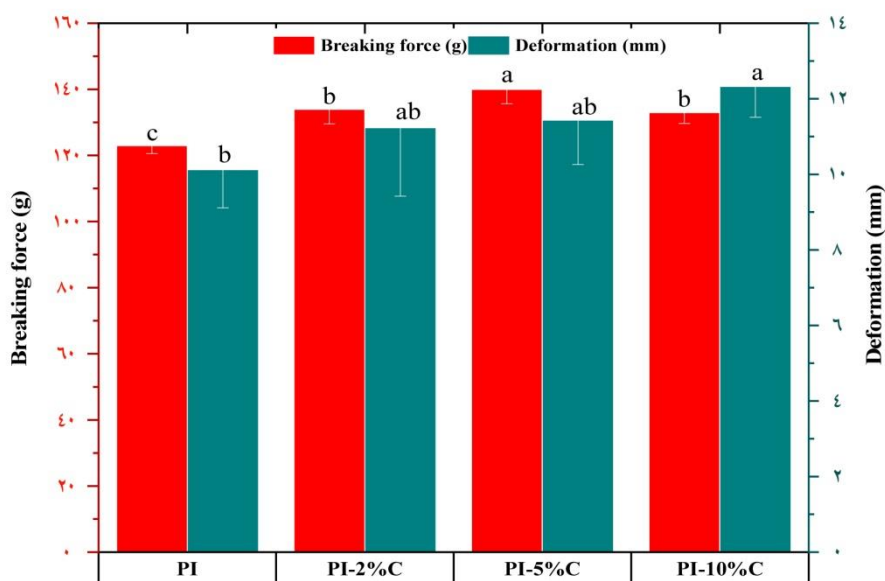
مشخصات کلاژن هیدرولیزشده: کلاژن هیدرولیزشده از باقی‌مانده‌های مرحله اول سانتریوفیوژ تهیه شد. درجه هیدرولیز محاسبه شده برای این کلاژن در حدود $16/63 \pm 0/8$ درصد بود. مقدار بازدهی کلاژن هیدرولیزشده $8/43 \pm 1/01$ درصد بر مبنای وزن خشک به‌دست آمد. درصد بازدهی استخراج کلاژن به عوامل متعددی مثل نوع گونه استفاده شده و ماهیت ساختاری بافت پیوندی آن، شرایط بیولوژیکی بافت و

روش استفاده شده برای استخراج بستگی دارد (۳۳). استخراج کلاژن عموماً به‌دلیل حلالیت پایین این پروتئین ناشی از برهمکنش‌های ایجاد شده بین آلدئیدها و لایزین و هیدروکسی لایزین در جایگاه‌های سه‌گانه تلویپتید ساختار کلاژن دشوار است (۳۴). استفاده از آنزیم در فرآیند استخراج و یا تولید کلاژن هیدرولیزشده می‌تواند در اثر شکست آنزیمی برهمکنش‌های مولکولی بر بازدهی اثر مثبت داشته باشد. عبدالهی و همکاران درصد بازدهی استخراج کلاژن هیدرولیزشده با پیپسین را ۱۵/۱ درصد گزارش کردند (۲۵). علت اختلاف در نتایج و کم‌تر بودن بازدهی در پژوهش حاضر را احتمالاً باید در ماهیت متفاوت مواد تحت تیمار و واکنش متفاوت آن‌ها به آنزیم پیپسین جست و جو کرد. با ذکر این دو دلیل که احتمالاً محتوای بافت پیوندی در ضایعات فرآیند تغییر pH فانوس‌ماهی کم‌تر بوده است و یا این‌که پیپسین در شکست باندهای پپتیدی و آزادسازی گروه‌های آب‌دوست کربوکسیل و آمید موجود در ساختار کلاژن ضعیف عمل کرده است.

ارزیابی بافت ژل: تأثیر کلاژن هیدرولیزشده بر ویژگی‌های بافتی ژل مطابق با نتایج ارائه شده در شکل ۳ می‌باشد. ژل یک سیستم دیسپرسیونی است که در آن مولکول‌ها تحت شرایط خاص ایجاد برهمکنش کرده و تشکیل شبکه می‌دهند. پروتئین‌ها عامل اصلی تشکیل ژل در سیستم‌های غذایی هستند و بنابراین توانایی تشکیل ژل آن‌ها بر کیفیت نهایی فرآورده غذایی تأثیر اساسی دارد (۳۵). ژل حاصل از پروتئین ایزوله نیروی شکست و تغییر شکل را به‌ترتیب در حدود ۱۲۳ g و $10/12$ میلی‌متر ارائه کرد. افزودن کلاژن هیدرولیزشده تا سطح ۵ درصد سبب بهبود نیروی شکست ژل شد اما پس از آن و در سطح ۱۰ درصد این شاخص کاهش نشان داد ($P < 0/05$). نیروی شکست در واقع بیان‌کننده میزان مقاومت

تولیدی از سوریمی اثر منفی داشتند. عبدالهی و همکاران (۲۵) پس از بررسی اثر کلاژن هیدرولیز شده با پپسین و پپسین-تریپسین بر ژل تولید شده از ایزوله پروتئین قلیایی ماهی فیتوفاگ بیان نمودند نوع اول کلاژن بر نیروی شکست اثر معنی‌دار نداشت و نوع دوم کلاژن سبب کاهش نیروی شکست شد. در این رابطه اثبات شد هیدرولیز دومرحله‌ای سبب تولید پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین‌تر به نسبت فرآیند تک‌مرحله‌ای می‌شود. بنابراین استدلال شد این پدیده سبب در معرض قرارگیری بیش‌تر گروه‌های باردار و آب‌دوست شده و احتمالاً این گروه‌ها طی فرآیند تشکیل ژل حرارتی بر آرایش شبکه ژل از طریق واکنش با جایگاه‌های فعال اکتورمبوزین و یا اختلال در جایگیری مناسب آب در سیستم ژل از طریق واکنش با آب و از دسترس خارج کردن نسبی آن اثر منفی گذاشته و مانع از تشکیل مناسب ژل شده‌اند. این نتایج البته با پژوهش حاضر تناقض داشت و علت آن را می‌توان در هیدرولیز شدن کم‌تر کلاژن طی فرآیند یک مرحله‌ای و ارائه استدلالی عکس آن‌چه بالا گفته شد توضیح داد. توضیح دیگر برای توجیه بهبود هم‌زمان نیروی شکست و تغییر شکل در ژل تولیدی از ایزوله فانوس‌ماهی را می‌توان به شکل‌گیری برهمکنش‌های بین مولکولی بین جایگاه‌های فعال کلاژن هم از نوع آب‌دوست و هم از نوع آب‌گریز با ایزوله پروتئین و کمک به تشکیل شبکه و به دام‌اندازی آب توضیح داد. این پدیده در آنالیز ظرفیت نگهداری آب در ژل نیز به خوبی مشهود بود به طوری که کلاژن تا سطح ده درصد سبب افزایش حدود ۱۵ درصدی ظرفیت نگهداری آب شد. پیش از این نشان داده شده است که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین آبزیان می‌توانند بر نحوه قرارگیری مولکول‌های آب در اطراف پروتئین‌های میوفیبریلی و ثبات حرارتی آن‌ها مؤثر باشند (۳۸).

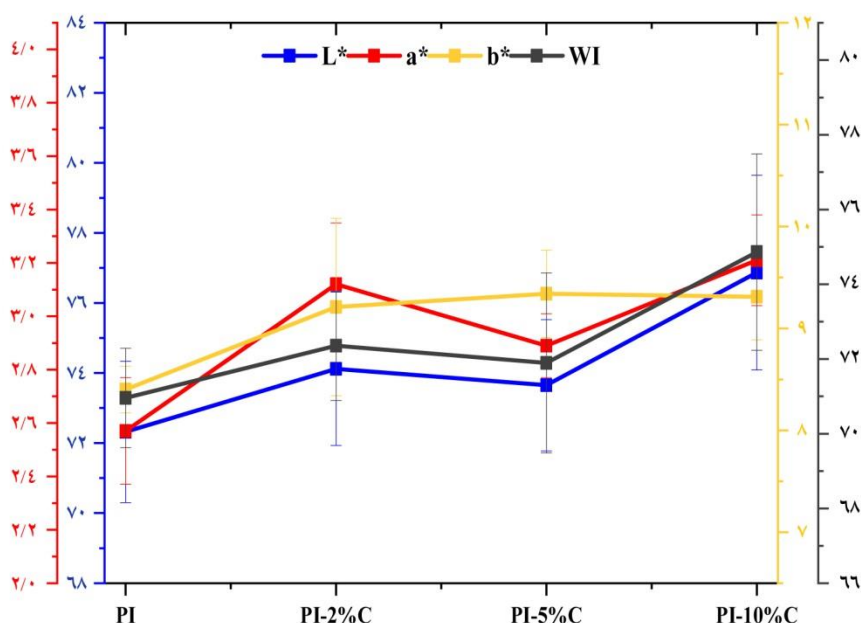
مکانیکی ژل است (حداکثر نیرویی که ژل در لحظه شکست تحمل می‌کند) و این روند داده‌ها نشان می‌دهد کلاژن هیدرولیز شده سبب بهبود استحکام ژل تا سطح ۵ درصد (وزنی/وزنی) شده و پس از آن روند استحکام نزولی شد ($P < 0/05$). هرچند لازم به ذکر است در سطح ۱۰ درصد نیز این شاخص نسبت به نمونه شاهد بالاتر بود ($P < 0/05$). تغییر شکل نشان‌دهنده قابلیت فشردگی ژل قبل از ازمه گسیختن است و به نوعی قابلیت ارتجاعی و کشسانی ژل را نشان می‌دهد. این شاخص با افزودن کلاژن به طور کلی افزایش نشان داد و بالاترین مقدار آن در نمونه ژل حاوی ۱۰ درصد کلاژن مشاهده شد ($P < 0/05$). مفروض است که انحلال قلیایی پروتئین‌ها و سپس رسوب آن‌ها در pH ایزوالکتریک سبب تغییرات کنفورماسیونی خاص منتج به بازشدن جزئی پروتئین‌ها می‌شود. این بازشدگی سبب در معرض قرارگیری اسیدهای آمینه خاص مخفی شده در درون مولکول به خصوص گلوتامین و لایزین می‌شود. این تغییرات سبب افزایش محتوای گروه‌های سولفیدریل و اکشنگر و هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین‌ها شده و بنابراین سبب می‌شوند گروه‌ها فعال بیش‌تری برای ایجاد برهمکنش‌های بین مولکولی با پروتئین‌های هیدرولیز شده در دسترس باشند (۳۶). این فعل و انفعالات می‌توانند در بهبود کیفیت ژل اثر مثبت داشته باشند. لو و همکاران (۳۷) بیان کردند پروتئین هیدرولیز جدا شده از فلس ماهی فیوفاگ (نمونه هیدرولیز شده با فلاوورزایم) سبب افزایش تغییر شکل و استحکام ژل تولیدی از سوریمی شد. مکانیسم اثر پروتئین‌های هیدرولیز شده در این کار به افزایش برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین شکل گرفته در اثر حضور پروتئین‌های هیدرولیز شده و بنابراین تشکیل شبکه ژل قوی‌تر نسبت داده شد. در این رابطه اما پروتئین‌های هیدرولیز شده با آلکالاز بر کیفیت ژل



شکل ۳- اثر کلاژن هیدرولیز شده با پپسین بر نیروی شکست و مقدار تغییر شکل ژل‌های حاصل از ایزوله پروتئین (PI) و ایزوله پروتئین حاوی ۲ (PI-2%C)، ۵ (PI-5%C) و ۱۰ درصد کلاژن هیدرولیز شده. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

ارتباط با نتایج پژوهش حاضر؛ یک عامل بهبود شاخص L^* و WI احتمالاً رنگ کلاژن به‌خصوص پس از هیدارته شدن بود که از شاخص سفیدی ۸۶/۳۴ برخوردار بود. در واقع همین عامل بود که سبب شد با افزوده شدن درصد کلاژن موجود در ژل شاخص سفیدی بهبود یابد. عبدالهی و همکاران یکی از دلایل بهبود شاخص سفیدی ژل تولیدی از پروتئین را به رنگ مناسب افزودنی ترانس گلوتامیناز میکروبی نسبت دادند (۳۶). افزایش ظرفیت نگهداری آب در ژل توسط کلاژن و توزیع مناسب آن در همه جهات و به‌ویژه در سطح ژل می‌تواند عامل دیگری در بهبود رنگ ژل باشد (۳۹). آب رها شده در سطح ژل درجه پراکنش نور را افزایش می‌دهد (۴۰). این پدیده می‌تواند در اثر برهمکنش‌های شکل گرفته در بستر ژل تقویت شده و پیامد آن در بهبود شاخص L^* ژل تولیدی قابل مشاهده است (۳۶).

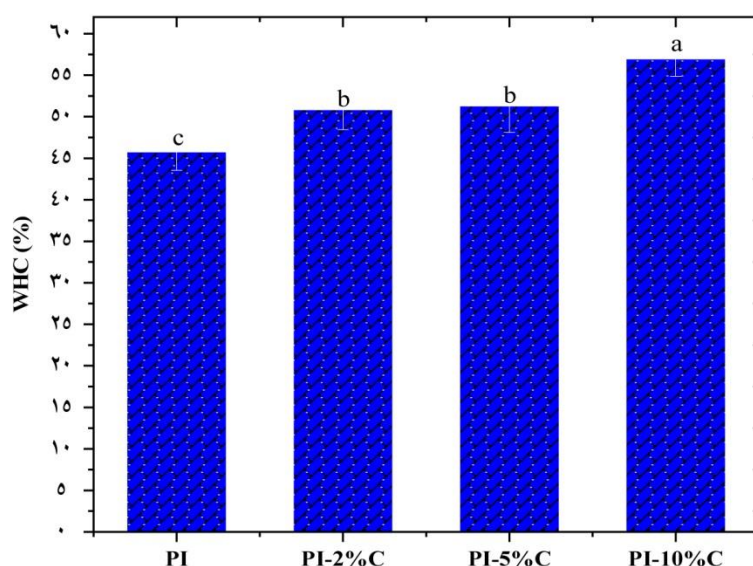
ارزیابی ویژگی‌های رنگ ژل: تغییرات شاخص‌های رنگ ژل‌های تولیدی شامل L^* ، a^* ، b^* و WI در شکل ۴ ارائه شده است. شاخص L^* با افزودن کلاژن تا سطح ۵ درصد (وزنی/وزنی) تغییر معنی‌داری نشان نداد اما در سطح ۱۰ درصد (وزنی/وزنی) این شاخص بهبود یافت ($P < 0.05$). شاخص سفیدی نیز همین روند را طی کرد و بالاترین شاخص سفیدی در نمونه حاوی ۱۰ درصد کلاژن هیدرولیز شده مشاهده شد. این نتایج با مشاهدات عبدالهی و همکاران (۲۵) مطابقت داشت. آن‌ها مشاهده کردند کلاژن هیدرولیز شده با پپسین سبب بهبود شاخص سفیدی در ژل شد اما کلاژن هیدرولیز شده پپسین-تریپسین این شاخص را به شکل معنی‌داری کاهش داد. لو و همکاران (۳۷) گزارش کردند افزودن پروتئین هیدرولیز شده جدا شده از فلس ماهی (نمونه هیدرولیز شده با فلاوورزایم) موجب بهبود سفیدی ژل سوریمی فیتوفاگ شد. در



شکل ۴- اثر کلاژن هیدرولیز شده با پیسین بر ویژگی‌های رنگ ژل‌های حاصل از ایزوله پروتئین (PI) و ایزوله پروتئین حاوی ۲ (PI-2%C)، ۵ (PI-5%C) و ۱۰ درصد کلاژن هیدرولیز شده.

گروه‌های باردار و آب‌دوست به مراتب بیشتر به نسبت پروتئین اولیه در دسترس برای واکنش با آب باشد. بنابراین این پپتیدها با واکنش هم‌زمان با آب و از طرفی کمک به تشکیل شبکه ژل پایدارتر می‌توانند سبب بهبود ظرفیت نگهداری آب در ژل شوند (۴۱). این پدیده به نوعی در آنالیز بافت ژل و اثر مثبت کلاژن هیدرولیز شده بر نیروی شکست ژل مشاهده شد. در واقع تشکیل تعداد مناسبی از برهمکنش‌های بین‌درون مولکولی منجر به تشکیل شبکه قوی‌تر و با قابلیت به دام‌اندازی آب بیشتر شده و آب آزاد قابل‌ترشح طی آنالیز WHC را کاهش می‌دهد (۳۵ و ۳۶). عبدالهی و همکاران (۲۵) در این رابطه گزارش کردن کلاژن هیدرولیز شده پیسین-تریپسین افزوده شده به ژل حاصل از ایزوله پروتئین قلیایی فیتوفاگ سبب بهبود ظرفیت نگهداری ژل حاصل از آن شد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت.

آنالیز ظرفیت نگهداری آب: ظرفیت نگهداری آب (WHC) یک شاخص برای سنجش توانایی ژل در ایجاد پیوند با آب است و یک پارامتر مهم در ارزیابی کیفیت ژل محسوب می‌شود. ژل‌های با WHC بالاتر برای کاربرد در سیستم‌های غذایی بر پایه ژل مطلوب‌تر می‌باشند (۳۵). نتایج حاصل از بررسی ظرفیت نگهداری آب ژل‌های مختلف در شکل ۵ ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود ظرفیت نگهداری آب در ژل حاصل از پروتئین در سطح نسبتاً پایینی مشاهده شد. افزودن کلاژن هیدرولیز شده در سطح ۲ و ۵ درصد (وزنی/وزنی) سبب افزایش اندکی در این شاخص شد ($P < 0/05$). بالاترین مقدار ظرفیت نگهداری آب در نمونه ژل حاوی ده درصد کلاژن هیدرولیز شده مشاهده شد که نشان‌دهنده توانایی بیشتر این ژل در ایجاد پیوند با مولکول‌های آب است. هیدرولیز کلاژن موجب تولید پپتیدهای کوتاه زنجیر می‌شود. این فرآیند سبب می‌شود



شکل ۵- اثر کلاژن هیدرولیز شده با پپسین بر ظرفیت نگهداری آب ژل‌های حاصل از ایزوله پروتئین (PI) و ایزوله پروتئین حاوی ۲ (PI-2%C)، ۵ (PI-5%C) و ۱۰ (PI-10%C) درصد کلاژن هیدرولیز شده. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

حرارتی استفاده شد. افزودن کلاژن هیدرولیز شده سبب بهبود نیروی شکست و مقدار تغییر شکل ژل شد. حضور کلاژن هیدرولیز شده هم‌چنین بر ویژگی‌های رنگ و به‌خصوص شاخص سفیدی و ظرفیت نگهداری آب در ژل‌ها اثر مثبت داشت. بنابراین استفاده هم‌زمان از تکنیک‌های بهینه‌سازی و رویکرد بیوریفاینری می‌تواند بر بهبود بازدهی کلی فرآیند باهدف تولید عناصر غذایی تشکیل‌دهنده ژل اثربخش بوده و می‌تواند گامی مثبت در جهت حرکت به سمت scale-up کردن فرآیند باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش از فرآیند تغییر pH قلیایی کمک شده با التراسونیک بهینه‌سازی شده به‌منظور بیشینه کردن درصد بازدهی استخراج و شاخص سفیدی پروتئین‌های عضله فانوس‌ماهی گونه بنتوسوما پتروتوم استفاده شد. استراتژی بهینه انتخاب شده با مشخصات بدین شرح؛ نسبت حلال به جامد 6 ml g^{-1} ، pH انحلال ۱۱/۵، توان التراسونیک ۳۱۰ W؛ و pH ترسیب ۵/۸ و با مطلوبیت ۰/۸۴؛ بازدهی ۵۳ درصد و شاخص سفیدی ۷۶/۸۱ را ارائه کرد. از این پروتئین در ترکیب با کلاژن هیدرولیز شده در تهیه ژل‌های

منابع

1. Wiech, M., Silva, M., Meier, S., Tibon, J., Berntssen, M. H. G., Duinker, A., & Sanden, M. (2020). Undesirables in mesopelagic species and implications for food and feed safety insights from norwegian fjords. *Foods*, 9 (9).
2. Nordhagen, A., Rizwan, A. A. M., Aakre, I., Reksten, A. M., Pincus, L. M., Bøkevoll, A., Mamun, A., Thilsted, S. H., Htut, T., Somasundaram, T., & Kjellevold, M. (2020). Nutrient composition of demersal, pelagic, and mesopelagic fish species sampled off the coast of bangladesh and their potential contribution to food and nutrition security-The EAF-nansen programme. *Foods*, 9 (6).

3. Alvheim, A. R., Kjellekvold, M., Strand, E., Sanden, M., & Wiech, M. (2020). Mesopelagic species and their potential contribution to food and feed security-a case study from Norway. *Foods*, 9 (3).
4. Abdollahi, M., Marmon, S., Chaijan, M., & Undeland, I. (2016). Tuning the pH-shift protein-isolation method for maximum hemoglobin-removal from blood rich fish muscle. *Food Chemistry*, 212, 213-224.
5. 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), 827-843.
6. Shaviklo, A. R., & Rafipour, F. (2013). Surimi and surimi seafood from whole ungutted myctophid mince. *LWT - Food Science and Technology*, 54 (2), 463-468.
7. Chai, H. J., Chan, Y. L., Li, T. L., Shiao, 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.
8. Chai, H. J., Chan, Y. L., Li, T. L., Chen, Y. C., Wu, C. H., Shiao, 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.
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 (Part B), 253-260.
10. Kakko, T., Aitta, E., Laaksonen, O., Tolvanen, P., Jokela, L., Salmi, T., Damerou, A., & 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 (April), 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 (November 2021).
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 (December 2020), 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 (August 2022), 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 (9), 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 (August 2022).
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 and 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 and Nutrition*, 8 (4), 1874-1887.
 19. Leong, Y. K., Yang, F. C., & Chang, J. S. (2021). Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 251).
 20. 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 and Technology*, 110 (September 2020), 90-106.
 21. 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 and Emerging Technologies*, 60 (January), 102308.
 22. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (5), 965-977.
 23. Chen, W., Wang, W. P., Zhang, H. S., & Huang, Q. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87 (1), 614-619.
 24. Undeland, I., Kelleher, S. D., & Hultin, H. O. (2002). Recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) light muscle by an acid or alkaline solubilization process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (25), 7371-7379.
 25. Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A., & Undeland, I. (2018). Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), a biorefinery approach. *Food Chemistry*, 242 (May 2017), 568-578.
 26. Chaijan, M., Panpipat, W., & Benjakul, S. (2010). Physicochemical and gelling properties of short-bodied mackerel (*Rastrelliger brachysoma*) protein isolate prepared using alkaline-aided process. *Food and Bioproducts Processing*, 88 (2-3), 174-180.
 27. Cardoso, C., Mendes, R., Vaz-Pires, P., & Nunes, M. L. (2010). Effect of salt and MTGase on the production of high quality gels from farmed sea bass. *Journal of Food Engineering*, 101 (1), 98-105.
 28. Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126, 72-81.
 29. Kristinsson, H. G., Theodore, A. E., Demir, N., & Ingadottir, B. (2006). 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.
 30. Cravotto, G., & Binello, A. (2016). Low-Frequency, High-Power Ultrasound-Assisted Food Component Extraction. In *Innovative Food Processing Technologies: Extraction, Separation, Component Modification and Process Intensification*. Elsevier.
 31. Bayar, N., Bouallegue, T., Achour, M., Kriaa, M., Bougatef, A., & Kammoun, R. (2017). Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. *Food Chemistry*, 235, 275-282.
 32. 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.
33. Pal, G. K., & Suresh, P. V. (2017). Comparative assessment of physico-chemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 32-40.
34. YU, D., CHI, C. F., WANG, B., DING, G. F., & LI, Z. R. (2014). Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12 (9), 712-720.
35. Li, J., Wu, M., Wang, Y., Li, K., Du, J., & Bai, Y. (2020). Effect of pH-shifting treatment on structural and heat induced gel properties of peanut protein isolate. *Food Chemistry*, 325 (April), 126921.
36. Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A., & Undeland, I. (2019). Effect of microbial transglutaminase and setting condition on gel properties of blend fish protein isolate recovered by alkaline solubilisation/isoelectric precipitation. *International Journal of Food Science and Technology*, 54 (3), 762-770.
37. Lu, H., Luo, Y., & Feng, L. (2014). Effects of Hydrolysates from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Scales on Rancidity Stability and Gel Properties of Fish Products. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (8), 2178-2188.
38. Nikoo, M., & Benjakul, S. (2015). Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant-cryoprotectant: A review. *Journal of Functional Foods*, 19, 753-764.
39. Kudre, T., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). Effects of protein isolates from black bean and mungbean on proteolysis and gel properties of surimi from sardine (*Sardinella albella*). *LWT - Food Science and Technology*, 50 (2), 511-518.
40. Tachasirinukun, P., Chaijan, M., & Riebroy, S. (2016). Effect of setting conditions on proteolysis and gelling properties of spotted featherback (*Chitala ornata*) muscle. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 318-323.
41. Wang, L. L., & Xiong, Y. L. (2005). Inhibition of Lipid Oxidation in Cooked Beef Patties by Hydrolyzed Potato Protein Is Related to Its Reducing and Radical Scavenging Ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (23), 9186-9192.

