

بهینه سازی آبکافت آنزیمی ضایعات حاصل از کشتار مرغ به روش سطح پاسخ

علی طاهری^{۱*}، عبدالمحمد عابدیان کناری^۲، علی معتمدزادگان^۳، مهران حبیبی رضایی^۴

۱- استادیار فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی،
۲- دانشیار گروه شیلات دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی، نور، مازندران، صندوق پستی ۳۵۶-۴۶۴۱۴
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران، صندوق پستی ۵۷۸
۴- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه تهران، دانشکده علوم پایه، آزمایشگاه بیوتکنولوژی پروتئین
(تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۲۳)

چکیده

در این تحقیق از روش سطح پاسخ (RSM) جهت بررسی تاثیر شرایط مختلف بر تولید پروتئین آبکافت شده ضایعات کشتارگاه مرغ با استفاده از آنزیم آلکالاز استفاده شد. طرح ترکیبی مرکزی (CCD) با ۳ عامل و ۵ سطح جهت بهینه سازی روند آبکافت و بررسی تاثیر فردی و متقابل عوامل آزمایش استفاده گردید. عوامل این آزمایش عبارت بودند از زمان (دقیقه)، دما (C) و نسبت آنزیم به سوبسترا (واحد آنسون بر گرم پروتئین)؛ درصد درجه آبکافت نیز به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. مدل ریاضی برازش خوبی با داده های آزمایش داشت زیرا R^2 ۰/۹۶ نشان داد که ۹۶٪ از تغییرات درون محدوده آزمایش توسط مدل قابل توضیح است. همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که فقدان تناسب مدل معنی دار نیست ($P > 0/05$). شرایط بهینه برای تولید پروتئین با درجه آبکافت ۱۵/۴۲٪ عبارت است از نسبت آنزیم به سوبسترای ۰/۰۷ واحد آنسون بر گرم پروتئین، زمان ۱۲۷/۶۹ دقیقه و دمای ۵۲/۵۱°C. بر اساس نتایج تجزیه اسید آمینه و شاخص شیمیایی، متیونین و هیستیدین اسیدهای آمینه محدود کننده بودند. در نتیجه گیری نهایی می توان اظهار داشت که مدل حاصل از توانایی خوبی برای پیش بینی درجه آبکافت پروتئین ضایعات کشتارگاه مرغ برخوردار است و این محصول قابل استفاده در جیره غذایی آبزیان و افزودنی در صنایع غذایی می باشد.

کلید واژگان: پروتئین آبکافت شده، آلکالاز، متیونین، هیستیدین، شاخص شیمیایی

۱- مقدمه

نویسنده در صنعت تولید مرغ در سال های اخیر به بازار وارد شده است [۴]. به منظور باقی ماندن در عرصه رقابت، صنایع مرغداری باید به سمت توسعه برای تولید محصولات جدید جهت افزایش بهره وری پیش رود [۵]. آبکافت آنزیمی پروتئین ها یک روش موفق برای فرآوری ضایعات کم مصرف می باشد که می تواند جهت نیل به این هدف مورد استفاده قرار گیرد. در جهان تولید پروتئین آبکافت شده از

میزان تولید مرغ در جهان سالانه بالغ بر ۷۳۴۰۲۶۹۵ تن می باشد که کشور ایران با تولید سالانه ۱۲۴۵۸۷۹ تن مقام دهم تولید مرغ جهان را داراست [۱]. ضایعات کشتارگاه مرغ که شامل امعاء و احشاء، خون، استخوان، سر، پا و پر می باشد ۲۸ تا ۳۰ درصد وزن کل تولید را به خود اختصاص می دهد [۳ و ۲]. این ضایعات غنی از پروتئین بوده و چنانچه بازیابی گردند محصولی با ارزش افزوده تولید می گردد. محصولات

* مسئول مکاتبات: ataheri@cmu.ac.ir

برده می شود [۲۶-۲۸]. این روش اثرات متقابل چندین عامل در محدوده متفاوت را ارزیابی می کند و ناحیه ای که نتایج در محدوده آن قرار دارند را به شکل یک سطح سه بعدی نشان می دهد [۲۶].

از آنجا که تا کنون تحقیقی روی بهینه سازی ضایعات کشتار مرغ با استفاده از آنزیم آلکالاز در دنیا انجام نشده است لذا در تحقیق حاضر به بهینه سازی تولید پروتئین آبکافت شده از ضایعات کشتارگاه مرغ به عنوان یک منبع پروتئینی قابل بازیافت با روش پاسخ سطحی پرداخته شده است. بهینه سازی بر اساس شرایط زمان، دما و میزان فعالیت آنزیم برای دستیابی به بالاترین درجه آبکافت توسط آنزیم آلکالاز صورت پذیرفته است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

ضایعات کشتارگاه مرغ شامل سر و پا از کشتارگاه صنعتی آمل طیور در شهرستان آمل تهیه و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد. آنزیم آلکالاز با فعالیت ۲/۴ واحد آنسون بر گرم از شرکت نووزایم در کشور دانمارک تهیه و تا زمان مصرف در ۴ درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

۲-۲- آبکافت

ضایعات مرغ اعم از سر و پا در یک چرخ گوشت نیمه صنعتی (شرکت هوتخش، ایران) با مش ۲ میلی متر چرخ گردید و سپس به نسبت یک به دو به ارلن مایر های ۲۵۰ میلی لیتری اضافه شد. ارلن ها برای ۲۰ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی گراد گرما دهی شدند تا آنزیم های داخلی آن غیر فعال گردند و چربی گوشت آزاد شود [۱۹،۱۲]. نمونه ها در دمای اتاق خنک شدند و در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد برای ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰×g (۴°C) برای جدا کردن اضافات گوشت و چربی سانتریفوژ شد. هر نمونه حاوی نسبت ۲:۱ از ۱۰۰ گرم ضایعات چرخ شده و تیمار شده دمایی به همراه محلول ۱۰ میلی مولار فسفات بافر در pH معادل ۸/۵ بود که پس از اضافه کردن مقدار مورد نیاز آنزیم آلکالاز در دما و زمان مشخص نگهداری شد. pH مخلوط حاصل توسط محلول هیدروکسید سدیم ۱ نرمال در نقطه ۸/۵ تنظیم شد. پس از زمان مورد نیاز تیمار جهت واکنش در انکوباتور شیکردار (۲۰۰ دور در دقیقه)، مخلوط ۲۰ دقیقه در حمام آبی ۸۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و آنزیم آلکالاز غیر فعال گردید. درجه

ماهی به طور گسترده در حال مطالعه است [۶-۱۳].

اما مطالعه در خصوص آبکافت آنزیمی ضایعات کشتارگاه طیور با استفاده از آنزیم های خارجی اندک است. آبکافت آنزیمی امعا و احشای غیر ماکول ماکیان به روش اتولیز و یا آبکافت گوشت مرغ تحقیقاتی انجام شده است [۵ و ۱۴] و همچنین پژوهشی به تولید پروتئین آبکافت شده از سر مرغ پرداخته است [۱۵ و ۱۶]. آبکافت آنزیمی پروتئین اجازه می دهد که نیتروژن بیشتر محلول شده و اسید های آمینه آزاد تشکیل گردد و در نتیجه یک منبع جدید اسید آمینه با قابلیت دسترسی بیشتر تولید گردد [۱۷ و ۱۸]. در نتیجه چنین منبع پروتئینی می تواند به عنوان یک افزودنی در آبرزی پروری و یک منبع غنی از نیتروژن در محیط کشت باکتری استفاده شود [۱۱، ۱۸، ۱۹]. پروتئین آبکافت شده پروفیل اسید آمینه مشابه منبع اصلی خود را دارد. البته محتوای برخی از اسیدهای آمینه مثل متیونین و تریپتوفان توسط آبکافت آنزیمی کاهش پیدا می کنند [۲۰]. روش تولید پروتئین آبکافت شده با استفاده از آنزیم های داخلی و یا خارجی می باشد اما افزودن آنزیم های خارجی می تواند روند آبکافت را کنترل نماید. تنوع آنزیم های پروتئولیتیک قابل استفاده در صنایع غذایی به آنزیم شناسان فرصت مناسبی برای تولید پروتئین آبکافت شده با کیفیت بالا می دهد. آنزیم های میکروبی بویژه آلکالاز (سیرین پروتئاز تهیه شده از باکتری *Bacillus licheniformis*) به دلیل تولید پروتئین با درجه بالای آبکافت در کوتاهترین زمان و در شرایط متعادل نسبت به آنزیم های ختئی یا اسیدی به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد [۲۱-۲۴]. در روند تولید پروتئین آبکافت بسته به ویژگی های خود آنزیم، شرایط محیطی و میزان آبکافت تنوع گسترده ای از پپتید ها با وزن مولکولی متفاوت بدست خواهد آمد. پروتئین آبکافت شده حاصله به دلیل وجود پپتید های جدید خواص کاربردی نوینی خواهد داشت.

چندین عامل مانند pH، زمان، فعالیت آنزیمی و دما بر عملکرد آنزیم تاثیر می گذارند و امکان کنترل فرآیند را فراهم می نمایند [۱۰، ۲۵]. در نتیجه باید در روند تولید بر اساس میزان تاثیر این عامل ها به یک شرایط بهینه دست یافت. روش بهینه سازی پاسخ سطحی^۱ امروزه در دنیا کاربرد فراوانی دارد. این روش در واقع مجموعه ای از روشهای تجربی، ریاضی و استنتاج آماری است که به طور فزاینده ای برای بهینه سازی در روند مطالعات فن آوری زیستی به کار

بینی تناسب استفاده شد. سطح پاسخ سه بعدی اثر متغیرهای مستقل روی پاسخ جهت تعیین اثر مستقل، متقابل و توان دوم متغیرها رسم و برای درک بهتر، نمودار دو بعدی برازش هر سطح سه بعدی بر افق نیز ترسیم گردید. در نهایت سه آزمایش بر اساس شرایط پیش بینی مدل برای تعیین صحت محاسبات ریاضی انجام پذیرفت.

۲-۴- تعیین میزان درجه آبکافت

پس از آبکافت، فاز محلول حاوی پروتئین آبکافت جدا گردید و محلول تری کلرو استیک اسید 20^1 ٪ به آن اضافه و نمونه ۲۰ دقیقه در $6000 \times g$ سانتریفوژ شد ($4^{\circ}C$) و محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ شفاف حاوی پروتئین های محلول جمع آوری شد. نیتروژن کل در محلول ۱۰٪ تری کلرو استیک اسید و فاز محلول حاصل از آبکافت توسط دستگاه اتوماتیک سنجش پروتئین مربوط به شرکت فوس (آلمان) سنجش شد. درجه آبکافت به شرح معادله ۲ بدست آمد [۲۹].

معادله ۲

$100 \times$ میزان نیتروژن در محلول 10^1 ٪ تری کلرو استیک اسید درجه آبکافت نیتروژن کل در نمونه

جدول ۲ طرح آزمایشی استفاده شده در روش پاسخ سطحی با ۳ متغیر مستقل و ۴ نقطه مرکزی که درجه آبکافت را به عنوان پاسخ نشان می دهد.

شماره آزمایش	سطوح متغیرها بر اساس کد			درجه آبکافت
	X_1	X_2	X_3	
۱	-۱	-۱	-۱	۶/۱۷
۲	-۱	-۱	۱	۸
۳	-۱	۱	-۱	۸/۳
۴	۱	۱	-۱	۹
۵	-۱	-۱	۱	۸/۳۳
۶	۱	-۱	۱	۹/۶۵
۷	-۱	۱	۱	۹/۵۸
۸	۱	۱	۱	۱۱/۳۳
۹	-۱/۶۸	۰	۰	۸/۴۲
۱۰	۱/۶۸	۰	۰	۱۳/۸۳
۱۱	۰	-۱/۶۸	۰	۷/۸۳
۱۲	۰	۱/۶۸	۰	۱۱/۷۹
۱۳	۰	۰	-۱/۶۸	۱۰/۵۷
۱۴	۰	۰	۱/۶۸	۱۶/۸
۱۵	۰	۰	۰	۱۷
۱۶	۰	۰	۰	۱۸/۱۸
۱۷	۰	۰	۰	۱۷/۱۹
۱۸	۰	۰	۰	۱۷/۴۲

آبکافت نمونه های آبکافت شده اندازه گیری شد. در نهایت بر اساس شرایط بهینه حاصل از مدل سطح پاسخ، پروتئین آبکافت شده تهیه و توسط دستگاه فریز درایر خشک و به پودر تبدیل شد.

۲-۳- بهینه سازی

از روش پاسخ سطحی^۱ برای بهینه سازی شرایط آبکافت استفاده گردید. این روش از ۳ طرح متفاوت استفاده می نماید که از میان آنها طرح ترکیبی مرکزی^۲ کاملترین است و در این آزمایش با ۵ سطح برای هر تیمار توسط نرم افزار Design-Expert 7 استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱ عامل ها و شرایط مورد استفاده در آزمایش بهینه سازی

عمل ها	نشانه	۰	-۱	۱	کد
غلظت آنزیم (آنسون بر گرم)	X_1	۰/۰۵۴۹	۰/۰۶۵	۰/۰۸۹۲	۰/۱۱۳۵
زمان آبکافت (دقیقه)	X_2	۴۰/۱۰۹	۶۳/۵	۱۲۰	۱۷۶/۵
دمای آبکافت ($^{\circ}C$)	X_3	۴۰/۱۰۲	۴۳	۵۰	۵۷

این طرح از نتایج ۱۸ آزمایش در ۱۸ نقطه پیشنهادی استفاده کرد که شامل ۸ نقطه سازگانی، ۶ نقطه محوری و ۴ نقطه حول مرکز تشکیل شده بود (جدول ۲). نتیجه درجه آبکافت به عنوان متغیر مستقل یا پاسخ نهایی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. مدل رگرسیونی چند جمله ای درجه ۲ (معادله ۱) برای پیش بینی میزان پاسخ استفاده گردید:

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

Y درجه آبکافت، β_0 عدد ثابت، β_i و β_{ii} و β_{ij} ضرایب تخمینی مدل، X_i و X_j سطوح متفاوت متغیرهای وابسته و β_{ij} باقیمانده حاصل از آزمایش تجربی است. از روش تجزیه واریانس برای بررسی معنی داری معادله و اثر متغیرها و پیش

1. RSM
2. Central composite design

۲-۵- ترکیب اسید آمینه

نمونه پروتئین آبکافت شده تولیدی حاصل از مدل بهینه شده سطح پاسخ برای سنجش محتوای اسید آمینه در اسید کلریدریک ۶ مولار و دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد برای ۲۲ ساعت آبکافت شدند. از کروماتوگرافی مایع فاز بالا^۲ مدل کنوتر آلمان و از ستون C₁₈ و دکتور فلوئورسنس RF-۵۳۰ بر اساس روش اورتوفتال دی آلدهید استفاده شد [۳۱،۳۰]. شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت شده بر اساس نسبت اسیدهای آمینه ضروری نمونه به اسید های آمینه ضروری استاندارد سنجیده شد [۳۳،۳۲،۱۸].

معادله ۳

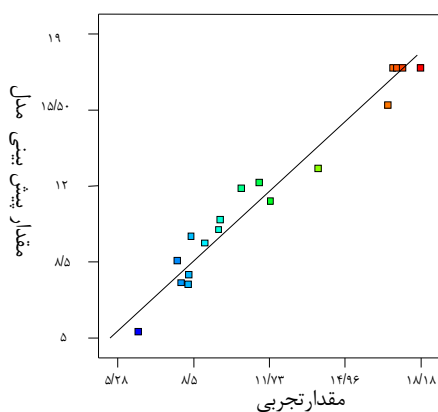
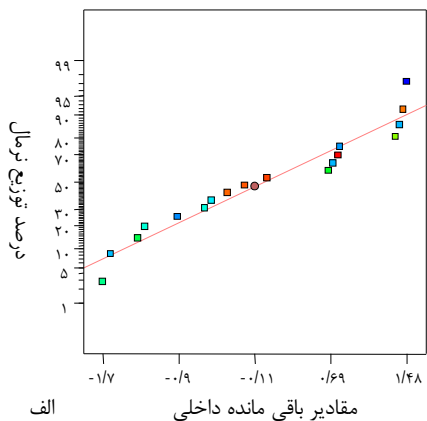
$$\frac{\text{اسید آمینه ضروری نمونه}}{\text{اسید آمینه ضروری استاندارد}} - \text{شاخص شیمیایی}$$

۳- نتایج

۳-۱- نتایج تجزیه واریانس

جدول ۳ نتایج تجزیه واریانس را نشان می دهد بر این اساس مدل در سطح احتمال ۹۹/۹۹٪ معنی دار است.

همچنین نتایج خطی اختلاف معنی داری نشان داد که در مورد دما این معنی داری بیشتر بود. سطح نتایج درجه دوم نیز اختلاف معنی داری نشان داد که این معنی داری در مورد زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بیشتر از دما مشهود بود. نتایج اثر متقابل نیز اختلاف معنی داری نسبت به هم نشان نداد ($p > 0.05$). توزیع احتمال نرمال داده ها و مقایسه نتایج حاصل از تخمین مدل و نتایج واقعی نیز در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱ توزیع احتمال نرمال (الف) و مقایسه مقدار پیش بینی مدل در برابر مقدار تجربی (ب)

ضریب تعیین کلی $R^2 = 0.9614$ نشان می دهد که مدل رگرسیونی واکنش را بسیار خوب توصیف می کند و می تواند تغییرات کلی را درون محدوده مقادیر مورد مطالعه توضیح دهد. R^2 محاسبه ای از اینکه چه مقدار پراکنش در پاسخ مورد مطالعه می تواند توسط متغیرها توضیح داده شود بدست می دهد. هر چقدر این مقدار به ۱ نزدیکتر باشد مدل بهتر پاسخ را پیش بینی می کند [۳۴]. نسبت سیگنال به اختلال^۳ باید در مدل های پاسخ سطحی بالاتر از ۴ باشد [۳۵]. این مقدار برای درجه آبکافت ۱۴/۱۴۹ بود و مدل از این حیث کارایی داشت. آزمایش فقدان تناسب در مدل ها معنی دار نبود (> 0.05) و این نشان می دهد که مدل از تناسب خوبی بر اساس داده های بدست آمده برخوردار است. فقدان تناسب، خطای باقیمانده را نسبت به خطای محض بررسی می کند (جدول ۳).

3. signal to noise ratio

1. TCA
2. HPLC

جدول ۳ جدول آنالیز واریانس درجه آبکافت تحت تاثیر

متغیرهای مستقل در طول آزمایش بهینه سازی

عامل ها	SS	df	MS	F	p
مدل	۲۶۳/۰۸	۹	۲۹/۳۳	۲۲/۱۱	۰/۰۰۰۱***
متغیرهای مستقل					
نسبت آنزیم به سوسترا (X1)	۱۴/۶	۱	۱۴/۶	۱۱/۰۴	۰/۰۱*
زمان (X2)	۱۱/۳۶	۱	۱۱/۳۶	۸/۵۹	۰/۰۱۹*
دما (X3)	۲۱/۹۴	۱	۲۱/۹۴	۱۶/۶	۰/۰۰۴***
اثر متقابل					
X2 X3	۰/۰۶۲	۱	۰/۰۶۲	۰/۰۴۷	۰/۸۳۴
X3 X1	۰/۰۲۷	۱	۰/۰۲۷	۰/۰۲۸	۰/۸۷۱
X3 X2	۵/۱۳۲	۱	۵/۱۳۲	۳/۸۸	۰/۹۵۲
توان دوم					
X12	۱۶/۴۲	۱	۱۶/۴۲	۵۷/۸۱	۰/۰۰۰۱***
X22	۱۱۲/۳۳	۱	۱۱۲/۳۳	۸۴/۹۸	۰/۰۰۰۱***
X32	۲۶/۲۶	۱	۲۶/۲۶	۱۹/۸۷	۰/۰۰۲۱**
فقدان تناسب	۹/۷۷	۵	۱/۹۵	۷/۲۷	۰/۰۶۷
خطای خلص	۰/۸۱	۳	۰/۲۷		
تصحیح کلی	۳۳/۶۶	۱۷			

* P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱، ***P<۰/۰۰۱

۳-۳- بهینه سازی سطوح پاسخ چندگانه

روش سطح پاسخ به شکل موفقیت آمیزی برای بهینه سازی عوامل تاثیر گزار بر روند آبکافت پروتئین ها مورد استفاده قرار گرفته است [۳۶، ۱۱]. این روش یک روش ریاضی طراحی آزمایش ها، ساخت مدل ها، تعیین تاثیر چندین عامل و جستجوی شرایط بهینه برای پاسخ های مورد نیاز است. نمودارهای سه بعدی پاسخ وقتی یکی از متغیرها در سطح مرکزی ثابت است و دوتای دیگر تغییر می کند در شکل (۲) نشان داده شده است. این نمودار ها نشان می دهد که زمان، دما و فعالیت آنزیم، آبکافت پروتئین را تحت تاثیر قرار می دهد.

۳-۳-۱- رابطه زمان و نسبت آنزیم به سوسترا بر روی درجه آبکافت

شکل (۲) تاثیر میزان مصرف آنزیم و زمان را روی درجه آبکافت پروتئین ضایعات کشتارگاه مرغ در سطح ثابت دمایی ۵۰°C نشان می دهد. در محدوده زمانی ۹۱/۷۵ تا ۱۵۳/۹ دقیقه و نسبت آنزیم به سوسترا از ۰/۰۷ تا ۰/۱۱ واحد آنسون بر گرم پروتئین درجه آبکافت بالایی مشاهده می شود و خارج از این محدوده افزایش زمان و میزان مصرف آنزیم تاثیری مثبتی روی درجه آبکافت ندارد.

۳-۳-۲- رابطه دما و نسبت آنزیم به سوسترا بر روی درجه آبکافت

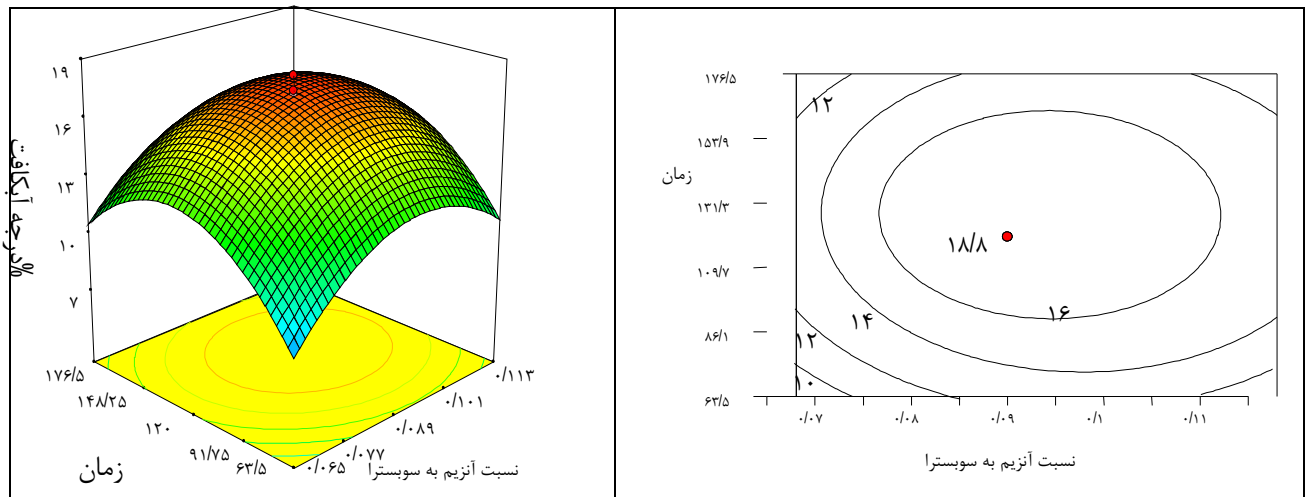
در شکل (۳) تاثیر میزان مصرف آنزیم و دما بر روی درجه آبکافت پروتئین ضایعات کشتارگاه مرغ وقتی که زمان در سطح ۱۲۰ دقیقه ثابت است مشاهده می گردد. دما در محدوده ۴۷ تا ۵۵°C و نسبت آنزیم به سوسترا ۰/۰۷ تا حدود ۰/۱۱ واحد آنسون بر گرم پروتئین درجه آبکافت بالایی مشاهده می شود و پس از آن افزایش دما باعث کاهش درجه آبکافت می گردد و افزایش میزان مصرف آنزیم تاثیری در میزان درجه آبکافت ندارد.

۳-۳-۳- رابطه زمان و دما بر روی درجه آبکافت

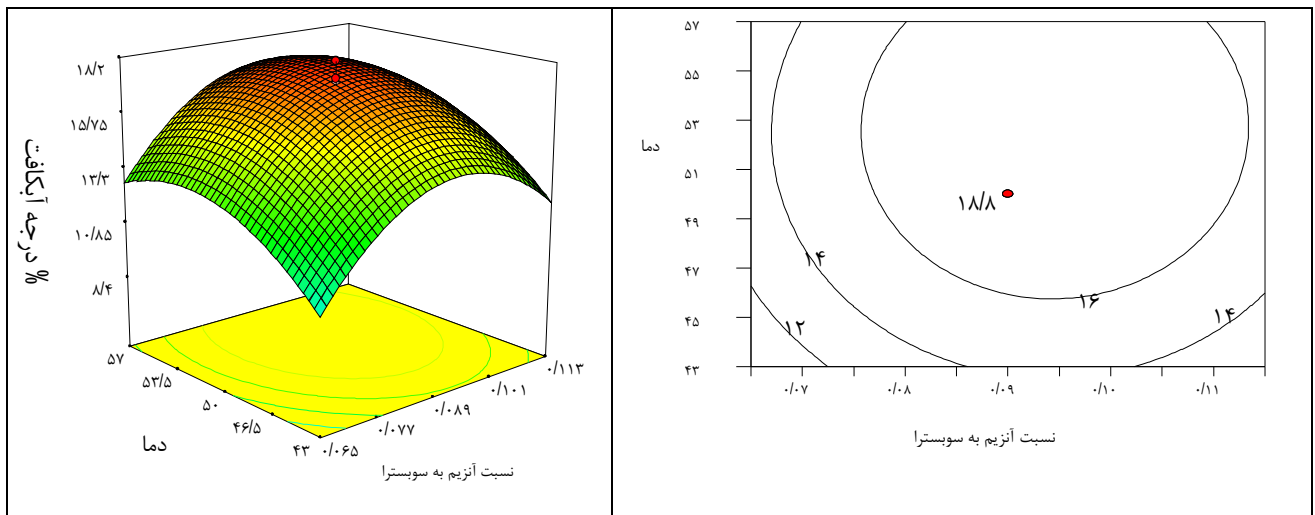
در شکل ۴ تاثیر زمان و دما بر روی درجه آبکافت پروتئین ساردین پهلوی طلایی وقتی که نسبت آنزیم به سوسترا در سطح ۰/۰۸۹ واحد آنسون بر گرم ثابت است مشاهده می گردد. در محدوده دمایی محدوده ۴۷ تا ۵۵°C و محدوده زمانی ۹۱/۷۵ تا ۱۵۳/۹ دقیقه بیشترین میزان درجه آبکافت مشاهده می گردد و خارج از این محدوده کاهش درجه آبکافت را شاهدیم.

۳-۲- تعبیر نمودارهای باقی مانده

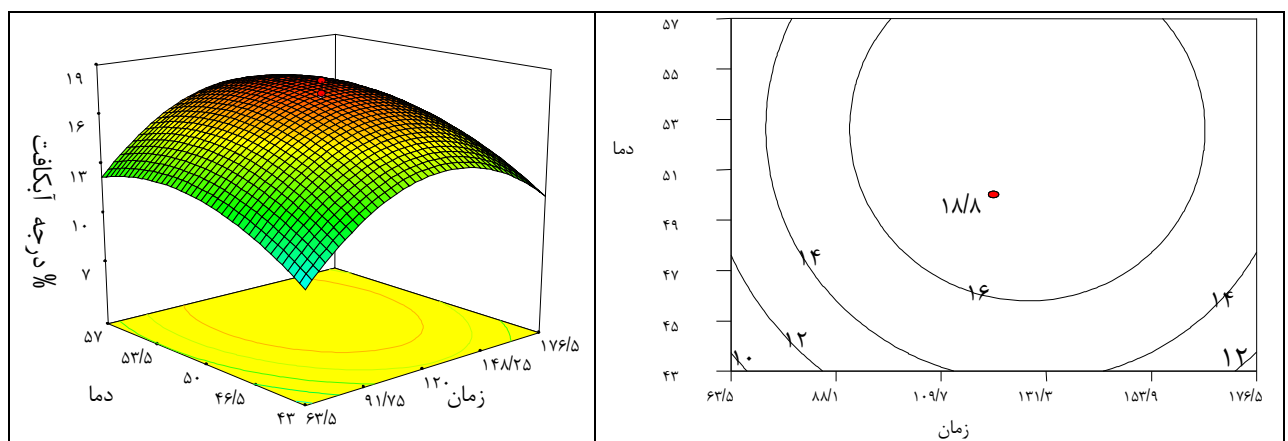
پلات احتمال نرمال که در شکل ۱- الف آورده شده نشان می دهد که پراکنش مقادیر باقی مانده که تفاوت بین میزان عددی پیش بینی و مقدار تجربی است خط مستقیمی را تشکیل می دهد و مقادیر باقی مانده به شکل نرمال در دو سمت این خط پراکنده اند. این نمودار نشان می دهد که نقطه مورد آزمایش به شکل معقول با مقدار پیش بینی شده توسط مدل همراستا بوده است. اما چون آزمایش مدل تعیین شده برای اطمینان از تطابق کافی با سامانه تجربی لازم است در نتیجه در تجزیه بعدی هر کدام از مقادیر تجربی برای درجه آبکافت با مقادیر پیش بینی شده مقایسه شد. در این مقایسه پلات هم ارجی (شکل ۱- ب) سطح نسبتاً قابل قبولی را ارائه می دهد. تمام این نتایج تفسیر ریاضی قابل قبولی از روند آبکافت توسط مدل را نشان می دهد و بیان می کند که مدل حاصل از توانایی خوبی برای پیش بینی درجه آبکافت تحت شرایط آزمایش برخوردار است.



شکل ۲ منحنی سطح پاسخ و تراز اثر زمان و نسبت آنزیم بر روی درصد درجه آبکافت



شکل ۳ منحنی سطح پاسخ و تراز اثر دما و نسبت آنزیم بر روی درصد درجه آبکافت



شکل ۴ منحنی سطح پاسخ و تراز اثر دما و زمان بر روی درصد درجه آبکافت

شود اگر مقادیر متغیرهای انتخابی در محدوده بهینه باشد درجه آبکافت تا زمانی که ترکیب زمان، دما و نسبت آنزیم به سویسترا به مقدار تولید حداکثر محصول برسد افزایش میابد.

نمودارهای سه بعدی حاصله در این آزمایش از نوع نمودارهای حداکثر است و می تواند میزان حداکثر پاسخ را در محدوده انتخابی نشان دهد. همانطور که در شکل ها دیده می

کشتارگاهی مرغ اگر نسبت آنزیم به سوبسترا از یک حد تجاوز نماید واکنش به سمت غیر فعال شدن پیش می رود و خود محصول تولیدی نیز می تواند عامل بازدارنده باشد.

از سوی دیگر در بررسی تاثیر عوامل مختلف بر روی درجه آبکافت در این مطالعه دیده شد که دو عامل دما و زمان نیز تاثیر معنی داری بر درجه آبکافت داشتند. کاهش درصد آبکافت با افزایش دما می تواند در اثر افزایش دنا تورا سیون آنزیم باشد که فعالیت بیولوژیک آنرا کاهش می دهد [۱۱،۹] و [۴۱]. در این رابطه تاثیر ترکیب pH، دما و زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا در طول آبکافت ماهیچه کوسه سگ ماهی، ضایعات فیله کنی کپور طلایی و پوست کپور علفخوار نیز تاثیر معنی داری بر شکست باندهای پپتیدی داشته است [۴۲،۴۱] و [۴۳].

۳-۳-۴ تعیین مدل پاسخ سطحی

از رگرسیون برای تعیین یک مدل سطح پاسخ بر اساس برآیند پاسخ های خطی و درجه دو و اثر متقابل متغیرهای مستقل استفاده شد. مدل رگرسیونی برای تخمین درجه آبکافت برای مقادیر واقعی در فرمول شماره ۳ آمده است.

$$\begin{aligned} \text{درجه آبکافت} = & X_1 (+971/45064) + (-148/90262) + X_2 (+0/30792) + X_3 (+3/86344) + X_4 (+0/064137) + X_5 (+0/36983) \\ & + X_6 X_7 (+6/40419) + X_7 X_1 (+0/40083) + X_7 X_2 (-0/036983) + X_7 X_3 (-1/17405) + X_7 X_4 (-5256/65208) \\ & X_7^2 \end{aligned}$$

(فرمول ۳)

۳-۳-۵ بهینه سازی و اعتبار سنجی مدل

در روند بهینه سازی میزان مصرف آنزیم حداقل و میزان درجه آبکافت حداکثر در نظر گرفته شد. همچنین زمان و دمای آبکافت آزاد شد تا در محدوده زمانی تعریف شده باشد. نتیجه حاصل از مدل عبارت بود از نسبت آنزیم به سوبسترای ۰/۰۷ واحد آنسون بر گرم پروتئین، زمان ۱۲۷/۶۹ دقیقه و دمای

اما اگر شرایط انتخابی آزمایش خارج از این محدوده باشد در عین اینکه این مقادیر ممکن است بالاتر از مقادیر انتخابی در محدوده بهینه باشد، درجه آبکافت نمی تواند به حداکثر برسد و سطح آن پایین تر از مقادیر حداکثر حاصل از محدوده بهینه خواهد بود. این مسئله تایید می کند که زمان، دما و میزان آنزیم مصرفی بر روی درجه آبکافت تاثیر دارد.

یکی از نکات مهم در مورد واکنش های کاتالیز شده آنزیمی این است که همچون سایر واکنش های شیمیایی باید از قوانین ترمودینامیک پیروی کنند. بویژه واکنش تنها در صورتی پیش می رود که با یک کاهش سطح انرژی آزاد اصلی همراه باشد. به عبارت دیگر انرژی گیبس در آن منفی باشد. در نتیجه غلظت سوبسترا باید در سطح مشخصی باشد تا واکنش انجام گیرد و میزان فرآورده نهایی بهینه باشد [۳۷]. بنابراین با افزایش غلظت سوبسترا، آنزیم اشباع شده و فعالیت آنزیم به سمت حداکثر پیش می رود. اما همیشه افزایش میزان سوبسترا دلیل بر کارایی بیشتر نیست و در مطالعات کینتیک آنزیمی یک رابطه کنشی بین میزان آنزیم و مقدار سوبسترا برقرار است و در یک نقطه یا محدوده بهینه کارایی آنزیم حداکثر خواهد بود [۳۸]. این مسئله می تواند توضیح دهد که چرا افزایش میزان آنزیم مصرفی از حد ۰/۱۱ واحد آنسون بر گرم پروتئین نمی تواند به تولید پروتئین با حداکثر درجه آبکافت منجر شود.

در مطالعات دیگر تولید پروتئین آبکافت شده از سر مرغ با استفاده از آنزیم نئوتراز نیز نشان داد که با کاهش غلظت سوبسترا آبکافت افزایش میابد [۱۵]. همچنین مطالعه روی پروتئین آبکافت شده ضایعات خرچنگ دراز آب شیرین با آنزیم اپتیماز نشان داد که درصد درجه آبکافت با کاهش غلظت سوبسترا به ۴۵٪ افزایش میابد [۳۹]. در تحقیقی دیگر نیز پروتئین های سبزیجات با آلکالاز آبکافت شد و مشاهده گردید که سامانه واکنش از بازدارندگی سوبسترا و غیر فعال شدن متاثر از غلظت آنزیم پیروی می نماید [۴۰]. بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که در واکنش آنزیمی پروتئین ضایعات

می تواند در جیره غذایی ماهی و همچنین به عنوان افزودنی در صنایع غذایی استفاده گردد.

۳-۷- نتیجه گیری کلی

استفاده از منابع شیلاتی کم مصرف و ضایعات صنایع غذایی امروزه توجه زیادی را به خود جلب کرده است که نشان می دهد این مواد حاوی ترکیبات با ارزشی است و می تواند به تولید مواد با ارزش افزوده بیانجامد. در این میان تولید پروتئین آبکافت شده از این منابع در سالیان اخیر مورد توجه بوده است. همچنین امروزه مطالعات گسترده ای بر روی تولید یک محصول در شرایط بهینه انجام می شود.

روش سطح پاسخ به شکل موفقیت آمیزی برای بهینه سازی عامل های تاثیر گزار بر روند هیدرولیز پروتئین ها مورد استفاده قرار گرفته است [۴۷]. این روش یک روش ریاضی طراحی آزمایشات، ساخت مدل ها، تعیین تاثیر چندین فاکتور و جستجوی شرایط بهینه برای پاسخ های مورد نیاز است. در این تحقیق بررسی نمودارهای باقی مانده، ضریب تعیین کلی R^2 ، تعیین فقدان تناسب، نسبت سیگنال به اختلال نشان داد که مدل حاصل از این آزمایش از تناسب و اطمینان خوبی برای پیش بینی درجه آبکافت پروتئین ضایعات کشتارگاهی برخوردار است. بر این اساس در شرایط نسبت آنزیم به سوسترای ۰/۰۷ واحد آنسون بر گرم پروتئین، زمان ۱۲۷/۶۹ دقیقه و دمای ۵۲/۵۱ درجه سانتی گراد پروتئین با درجه آبکافت ۱۵/۴۲٪ بدست خواهد آمد. این پروتئین آبکافت شده قابلیت استفاده در جیره غذایی آبزیان و صنایع غذایی را دارا خواهد بود.

۵۲/۵۱ درجه سانتی گراد که در نتیجه بر اساس چنین شرایطی درجه آبکافت برابر ۱۵/۴۲٪ بدست آمد.

برای تعیین اعتبار مدل سه آزمایش تحت شرایط بهینه انجام شد که درجه آبکافت $0/28 \pm 15/44$ ٪ بدست آمد. نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از پیش بینی مدل مطابقت دارد و در نتیجه اثبات می کند که مدل قوی است و برای تخمین نتایج آزمایش قابل کاربرد است.

۳-۶- ترکیب اسید آمینه پروتئین آبکافت شده

تهیه شده در شرایط بهینه

ارزش غذایی مواد غذایی به نوع و مقدار اسیدهای آمینه مورد نیاز بدن وابسته است. پودر پروتئین آبکافت شده ضایعات کشتارگاه مرغ سفید بود و از شاخص شیمیایی جهت تعیین ارزش غذایی این پروتئین استفاده شد (جدول ۴).

شاخص شیمیایی سطح اسیدهای آمینه ضروری بین نمونه مورد مطالعه و پروتئین استاندارد را مقایسه می کند و شاخصی از ارزش غذایی پروتئین می باشد [۴۴]. در مطالعه حاضر شاخص شیمیایی بر اساس پروتئین مرجع FAO/WHO برای انسان های بالغ و NRC برای ماهیان کپور جوان محاسبه گردید [۳۳، ۳۲]. بر این اساس متیونین و هیستیدین بر اساس هر دو مرجع اسیدهای آمینه محدود کننده بودند. بر اساس مرجع فائو اسیدهای آمینه ایزو لوسین، لوسین و والین و بر اساس مرجع NRC فنیل آلانین نیز محدود کننده بود. بقیه اسید های آمینه ضروری بر اساس مرجع های استاندارد در حد مورد نیاز موجود بودند. بیشترین میزان اسید های آمینه غیر ضروری گلایسین با مقدار ۱۷/۶٪ بود. در این مطالعه از سر و پای مرغ استفاده شد و مشاهده مقدار بالای گلایسین ممکن است به علت وجود پوست و استخوان موجود باشد که محتوای کلاژن بالایی دارد و کلاژن میزان بالایی گلایسین دارد. محتوای اسید آمینه در پروتئین آبکافت شده نشان می دهد که این پروتئین

جدول ۴ ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین آبکافت شده ماهی ساردین پهلو طلایی و شاخص شیمیایی آن در مقایسه با پروتئین مرجع FAO/WHO (گرم در ۱۰۰ گرم)

شاخص شیمیایی	درصد اسید آمینه				پروتئین هیدرولیز شده
	الف	پروتئین مرجع ۲	پروتئین مرجع ۱	ب	
					اسیدهای آمینه ضروری
۰/۴۸	۰/۵	۲/۱	۲	۱/۰۱	هیستیدین
۱/۵۲	۰/۹۵	۲/۵	۴	۳/۸	ایزولوسین
۱/۸۵	۰/۸۷	۳/۳	۷	۶/۱۱	لوسین
۱/۰۷	۱/۱	۵/۷	۵/۵	۶/۱	لیزین
۰/۷۱	۰/۶۳	۳/۱	۳/۵	۲/۲۱	متیونین
۰/۹۵	۱/۴۴	۶/۵	۴/۲۹	۱/۴	فنیل آلانین
		-	-	۴/۸	تیروزین
۱/۷۷	۱/۷۲	۳/۹	۴	۶/۹	ترئونین
۳/۸۶	۱/۰۱۲	۱/۳۱	۵	۵/۰۶	آرژنین
۱/۴	۰/۹۳	۳/۶	۵/۴۲	۵/۰۲	والین
					اسیدهای آمینه غیر ضروری
				۱/۲	آسپارتیک اسید
				۲/۷	گلوتامیک اسید
				۲/۲	سرین
				۱۷/۶	گلیسین
				۶/۱۸	آلانین

۱- میزان مورد نیاز - اسید آمینه بر اساس مرجع FAO/WHO

۲- میزان مورد نیاز اسید آمینه بر اساس مرجع NRC (1993)

Processing and Utilization. CRC press, New York, pp. 439-455.

[3] Panda, B., Singh, R.P. 1980. Processing and utilization of poultry industrial by-products. By-products from food Industries, utilization and disposal. In: Association of Food Technologist, India, Symposium proceedings, 58-63.

[4] Barbut, S. 2002. Poultry products processing, an industry guide. 548 p. Boca Raton, CRC Press.

[5] Kurozawa, L.E., Park, K.J. and Hubinger, M.D. 2008. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Chicken Meat Using Response Surface Methodology. Journal of Food Science, 73, 405-412.

[6] Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Berge, J.P. 2006. Improvement of lipid and phospholipid

۴- تقدیر و تشکر

نویسندگان از دانشگاه تربیت مدرس به جهت فراهم آوردن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی کرده و از آقای دکتر محمود رضا اویسی پور و مهندس علیرضا افشاری کارمند معاونت آبیاری پروری شیلات سیستان به جهت همکاری و کمک های بی دریغ تشکر می نمایند.

۵- منابع

[1] FAOSTAT-Agriculture. 2009. Online available at: <http://faostat.fao.org>.

[2] Ockerman, H.W., Hansen, C.L. 2000. Poultry by-products. In: Ockerman, H.W., Hansen, C.L. (Eds.), Animal by Product

- [17] Espe, M., Raa, J., Njaa, L.R. 1989. Nutritional value of stored fish silage as protein source of young rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49, 259–270.
- [18] Vidotti, R.M., Viegas, E.M.M., Careiro, D.J. 2003. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*, 105, 199–204.
- [19] Guerard, F., Duffose, L., De La Broise, D., Binet, A. 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1051–1059.
- [20] Shuler, P. 1990. Natural antioxidants exploited commercially. In: Hudson B, editor. *Food antioxidants*. New York: Elsevier Applied Science p. 99–170.
- [21] Je, J.Y., Park, P.J., Kim, S.K. 2004. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res Intern*, 38(1), 45–50.
- [22] Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., Kim, S.K. 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J Nutr Biochem*, 16(9), 562–569.
- [23] Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, K.S., Joo, D.S., Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatine hydrolysate of Alaska Pollack skin. *J Agric Food Chem*, 49, 1984–1989.
- [24] Shahidi, F., Amarowick, R. 1996. Antioxidant activity of protein hydrolysates from aquatic species. *JAOCS*, 73, 1197–1199.
- [25] Viera, G.H.F., Martin, A.M., Sampaio, S.S., Omar, S., Gonsalves, R.C.F., 1995. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* spp.) processing wastes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69, 61–65.
- [26] Chen, Q.H., He, G.Q. and Ali, M.A.M. 2002. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology. *Enzyme and microbial Technology*, 30, 667–672.
- [27] Rao, K.J., Kim, C.H. and Rhee, s.k. 2000. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41, 2327–2332.
- [7] FAO STAT-Agriculture, 2010. [Online], Available from: <http://faostat.fao.org>.
- [8] Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A. 2000a. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 657–666.
- [9] Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A. 2000b. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81.
- [10] Liaset, B., Lied, E., Espe, M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 581–589.
- [11] Nilsang, S., Lertsiri, S., Supphantharika, M., Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70, 571–578.
- [12] Bhaskar, N., Modi, V.K., Govindaraju, K., Radha, C., Lalitha, R.G. 2007. Utilization of meat industry by-products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, 98, 388–394.
- [13] Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115, 238–242.
- [14] Jamdar, S.N., Harikumar, P. 2008. A rapid autolytic method for the preparation of protein hydrolysate from poultry viscera. *Bioresource Technology*, 99, 6934–6940.
- [15] Surowka, K. and Fik, M. 1992. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *International Journal of Food Science Technology*, 27, 9–20.
- [16] Surowka, K. and Fik, M. 1994. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. II. Application of pepsin to the production of protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65, 289–296.

- reactor. *Journal of Food Engineering*, 80, 1134–1145.
- [37] Barman, T.E. 1969. *Enzyme handbook*; Springer Verlag, Berlin.
- [38] Palmer, T. 1981. *Understanding enzymes*. Ellis Horwood, Chichester.
- [39] Baek, H.H. and Cadwallader, K.R. 1995. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *Journal of Food Science*. 60, 929-935.
- [40] Moreno, M.M.C. and Cuadrado, V.F. 1993. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, 28, 481-490.
- [41] Wasswa, J., Tang, J., Gub, X., Yuan, X, 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin, *Food Chemistry*, 104,1698–1704.
- [42] Diniz, F.M. and Martin, A.M. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 419–426.
- [43] Sumaya-Martinez, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa, S. and Prado-Barragan, L.A. 2005. Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*). I. A study of hydrolysis parameters using response surface methodology. *J. Sci. Food Agric*. 85, 98–104.
- [44] Sgarbieri, V.C. 1987. *Alimentacao e Nutricao: Fator de saude edesenvolvimento*. UNICAMP, Campinas, Brazil.
- [45] FAO/WHO. 1985. Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724, pp. 116–129.
- saccharomyces cerevisiae using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 35, 639-647.
- [28] Souza, M.C.D., Roberto, I.c. and Milagres, A.M.F. 1999. Solid-State fermentation of Xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 768-772.
- [29] Hoyle, N.T., and Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59, 76–79,129.
- [30] Lindroth, P., Mopper, K. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Analyt Chem*, 51, 1667–1674.
- [31] Flynn, K.J. 1988. Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. *Chem Ecol*,3:269–93.
- [32] FAO/WHO. 1985. Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724, pp. 116–129.
- [33] NRC. 1993. National Research Council – nutrient requirements of Fish. National Academy of Sciences, Washington, 124p.
- [34] Liu, H.L. and Chiou, Y.R. 2005. Optimal decolorization efficiency of Reactive Red 239 by UV/TiO₂ photocatalytic process coupled with response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 112: 173–179.
- [35] Canettieri, E. V., Rocha, G. J., Carvalho, J. A., & Silva, J. B. 2007. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of Eucalyptus grandis residue using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 98(2), 422-428.
- [36] Cheison, S. C., Wang, Z., and Xu, S. Y. 2007. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane

Process optimization of Poultry By-products hydrolysate production by RSM

Taheri, A. ^{1*}, Abedian Kenari, A. M. ², Motamedzadegan, A. ³, Habibi Rezaie, M. ⁴

1. Seafood Section, Fisheries Group, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Sistan and Balouchestan, Iran
2. Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran,
3. Department of Food Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari,
4. School of Biology, Department of science, Tehran University, Enghelab Ave. Tehran, Iran

(Received: 89/2/12 Accepted: 89/8/23)

In this study Response Surface Methodology (RSM) was employed to investigate the effects of different operating conditions on the hydrolysis process of poultry by-products protein by the alcalase. Central Composite Design (CCD) by 5-level and 3-factor was used for the optimization of the hydrolysate production and to evaluate the effects and interactions of process variables: time (minute), temperature (C°) and enzyme to substrate ratio on the response. The response was included degree of hydrolysis (%). The mathematical model showed good fit with the experimental data, since the R² of 0.96 indicated that 96% of the variability within the range of values studied could be explained by the model. Furthermore lack of fit of the model was not significant (p<0.05). The optimum conditions for production of poultry by-products protein hydrolysate by 15.24% degree of hydrolysis were established as an enzyme activity to substrate ratio 0.07 AU/g protein; time 127.69 minute, and temperature 52.51°C. According to amino acid analysis and chemical score, methionine and histidine was the limiting amino acids in the hydrolysate. The poultry by-products protein hydrolysate tends to be a potential source in balanced fish diets and functional additive in food industries.

Key Words: hydrolysate, Poultry by-products, alcalase, Histidine, Methionine, Chemical score

* Corresponding Author E-Mail address: ataheri@cmu.ac.ir