تولید کنسانتره پروتئینی از ضایعات صدف بزرگ *Megapitaria squalid* و بررسی برخی از خصوصیات شیمیایی آن

نصراله احمدی فرد [1*]، خولیو همبرتو کوردوا مورتو [2]

۱- استادیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه- ارومیه، ایران

۲- استادیار گروه بیوشیمی- مرکز تحقیقات دریایی (سیبنور) کالیفرنیای جنوبی مکزیک

(تاریخ دریافت: ۹٤/۰۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۱۲)

چکیده

با توجه به رشد روز افزون نیاز به پروتئین حیوانی تولید محصولات با ارزش افزوده بالا از ضایعات موجودات دریایی بیشتر مورد توجه است. صدف کلم *Megapitaria squalid* از نظر ارزش غذایی حائز اهمیت می باشد. در تحقیق حاضر با استفاده از تغییر pH (قلیایی و اسیدی) امعاء و احشاء صدف کلم برای استخراج پروتئین و ارزیابی آن از نظر حلالیت، بازیافت پروتئین و ترکیب شیمیایی در شرایط دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفت. اساس کار بر استخراج پروتئین در pH های قلیایی و اسیدی و سپس رسوب آن در نقطه ایزوالکتریک بود. بر اساس نتایج در حدود ۹۳٪ پروتئین اولیه امعاء و احشاء در pH حل شدند. مقدار پروتئین رسوب داده شده و بازیافت پروتئین کل از مواد اولیه به ترتیب برابر با ۸۹٪ و ۸٤٪ پروتئین اولیه بود. میزان حلالیت پروتئین‌های مواد اولیه خام با استفاده از pH های قلیایی و اسیدی روی ژل پلی آکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ژل نیز موید نتایج حلالیت بالای پروتئین در pH های قلیایی بود. مقادیر پروتئین و اسیدهای آمینه کنسانتره پروتئینی حاصل شده به ترتیب به میزان ۷۲/۷٪ و ٦٦۳/۲۳ میلی گرم بر گرم (بر اساس وزن خشک) بود. تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از شرایط قلیایی در pH برابر ۱۱ برای بازیافت پروتئین از ضایعات صدف کلم و تبدیل آن به یک ماده با ارزش افزوده بالا مفید می‌باشد و در نهایت از محصول تولید شده می توان به مکمل غذایی در دام و غذای انسان استفاده کرد.

کلید واژگان: کنسانتره پروتئینی، امعاء و احشاء، خصوصیات شیمیایی، صدف *Megapitaria squalid*

* مسئول مکاتبات: n.ahmadifard@urmia.ac.ir

۱- مقدمه

بر اساس آمار رسمی سازمان خوار و بار جهانی، میزان تولید سالانه آبزیان بالغ بر ۱۳۲ میلیون تن می‌باشد [۱]. این میزان نسبتاً بالای صید جهانی و به دنبال آن صنایع عمل‌آوری، منجر به تولید حجم بالایی از موادجانبی و غیرقابل استفاده گردیده که بدون هیچگونه توجه زیست محیطی، دور ریخته می‌شود. عمده‌ترین مواد جانبی صنایع عمل‌آوری آبزیان شامل امعاء و احشاء، پوست، فلس، ستون مهره و استخوانهای تنه می‌باشد [۲]. این ضایعات صنایع شیلاتی غنی از پروتئین و چربی بوده که باعث تسریع فساد در آنها می‌گردد [۳]. اگر این ترکیبات بیولوژیکی به خوبی استفاده شود، از یک سمت باعث کاهش آلودگی زیست‌محیطی ناشی از دور ریختن آنها شده و از سوی دیگر تولید محصولاتی با ارزش افزوده بالارا به دنبال خواهند داشت.

در حال حاضر، صدف‌های دوکفه‌ای، بخش مهمی از تولیدات شیلاتی را به خود اختصاص می‌دهند. بر اساس آمار ارائه شده توسط فائو، در سال ۲۰۱۱، بیش از ۱۱ میلیون تن صدف از طریق فعالیت‌های آبزی پروری حاصل شده است؛ بطوریکه با رشد ٤/٦ درصدی نسبت به سال قبل، بعد از ماهیان آب-شیرین، جزو دومین گروه آبزی پرورشی، قرار گرفته‌اند [۱].

خانواده مرسراریده (Merceraridae) که به آنها کلم (Clam) گویند بزرگترین صدف‌های جهان در این خانواده می‌باشند. وزن گونه‌ای از این‌ها در استرالیا به نام Giant Clam به ۱۵۰ کیلوگرم می‌رسد. مقادیر بسیار زیادی از صدف‌های این خانواده از رودخانه باهوکلات خور گواتر جمع‌آوری شده است، این صدف‌ها در عمق ۱۵-۱۰ سانتی-متری بستر لجنی مستقر می‌شوند [٤]. بر اساس حجم صید مقادیر بالایی از صدف شکلاتی *Megapitaria squalida*is توسط افراد مختلف ساکن در سواحل اقیانوس آرام صید می‌شود [٥]. عضلات صدف کلم منبع غنی از پروتئین می باشد، اما مقادیر عظیمی از امعاء و احشاء آن بدون توجه به مسائل زیست محیطی دور ریخته می شود. امعاء و احشاء کلم نزدیک به ۲۰٪ بافت نرم را شامل می‌شود [٦]. این ماده را می‌توان به محصولات غذایی به عنوان مکمل پروتئینی اضافه و یا به عنوان محصول جدید براساس خصوصیات کاربردی آن معرفی کرد. به دلیل وجود اسیدهای آمینه آزاد و بوی نامطبوع آن در ضایعات مصرف مستقیم آن در کارخانجات غذایی امکان پذیر نبوده لذا نیاز است تا بر روی آن فرآوری صورت گیرد. تولید کنسانتره‌های پروتئینی به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد که روش شیمیایی به علت آسان بودن و ارزان قیمت بودن بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد [۷]. در روش شیمیایی با استفاده از شرایط قلیایی و یا اسیدی پروتئین‌ها به صورت محلول در آمده و سپس با استفاده از اسید و یا سود نرمال در نقطه ایزوالکتریک رسوب داده می‌شود. گروهی از محققین [۷ ، ۸ و ۹] توانستند ایزوله و یا کنسانتره پروتئینی از منابع مختلف تولید کرده و با بررسی خصوصیات کاربردی آن را به عنوان یک منبع غذایی پروتئینی مطرح و پیشنهاد نمایند.

ارزش غذایی یک پروتئین بستگی زیادی به میزان، تنوع و ترکیب اسیدهای آمینه آن پروتئین دارد. روش‌های مختلفی برای تعیین ارزش غذایی پروتئین‌ها وجود دارد که یکی از روش‌های متداول، روشهای زیستی و آزمایشگاهی است، ولی از جمله معایب این روش میتوان به وقت گیر و پر هزینه بودن آن اشاره نمود. ولی با استفاده از ترکیب اسیدهای آمینه یک پروتئین، می‌توان نرخ کارایی پروتئین را پیش بینی نمود [۱۰]. یکی دیگر از پارامترهای بررسی خواص پروتئینی کنسانتره‌های تولیدی، بررسی شاخص شیمیایی می‌باشد که مبتنی بر ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین است. شاخص شیمیایی با استفاده از مقایسه بین اسیدهای آمینه ضروری پروتئین مورد آزمایش و میزان نیاز انسان [۱۱] و یا یک آبزی [۱۲] محاسبه می‌گردد. با توجه به مطالب بیان شده، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر روش pH-stat بر بازیافت نیتروژنی، نرخ کارایی پروتئین و شاخص شیمیایی کنسانتره پروتئینی تولید یا معاء و احشاء صدف Clam انجام شده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- تهیه و آماده‌سازی نمونه

بعد از تهیه امعاء و احشاء صدف کلم از مراکز صید، نمونه‌ها به همراه یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های تهیه شده با استفاده از چرخ گوشت به مدت ۳۰ ثانیه کاملاً هموژن و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۲- منحنی حلالیت پروتئین

برای تهیه منحنی حلالیت پروتئین یک بخش از مواد خام هموژن شده با ۲/۵ حجم از آب مقطر مخلوط شدند (نسبت ۱ به ۳/۵) و ۵۰ میلی لیتر از آن برداشت و با استفاده از سود و یا اسید نرمال به pHهای ۱ تا ۱۳ تنظیم شدند. در هر pH یک میلی‌لیتر از هموژن تهیه شده برداشت و با استفاده از سانتریفوژ با دور g۱۰۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. قسمت رسوب شده دور ریخته شدند و از قسمت رویی برای بررسی پروتئین حل شده با استفاده از روش بیورت [۱۳] استفاده شد. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی استفاده و قرائت در طول موج ٥٤٠ نانومتر اسپکتروفتومتر مدل ٦٣٠٥ انگلستان انجام شد. بر اساس نتایج، pH برای مطالعات بعدی استفاده گردید.

۲-۳- تهیه کنسانتره پروتئینی و تعیین میزان بازیافت پروتئین

برای انجام این آزمایش ابتدا هموژن تهیه شده با آب مقطر با نسبت ۳/۵: ۱ رقیق و سپس با استفاده از سود نرمال pH هموژن تهیه شده به ۱۱ رسانده شدند. با استفاده از اسید HCl در نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های حل شده رسوب داده شدند. بعد از سانتریفوژ کردن با دور g۱۰۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه بخش رسوب شده به عنوان کنسانتره پروتئینی نام گرفت. کنسانتره پروتئینی بعد از خشک شدن برای آنالیز تقریبی استفاده گردید. همچنین بعد از سانتریفوژ کردن مقدار پروتئین حل شده در قسمت فوقانی محلول تهیه شده با استفاده از اسپکتروفتومتر محاسبه شد [۹].

۲-٤- ترکیب شیمیایی مواد خام و کنسانتره پروتئینی

ترکیبات شیمیایی کنسانتره پروتئینی تولید شده به روش AOAC[١٤] تعیین گردید. نیتروژن کل بر اساس روش کجلدال (230-Hjeltec Analyzer; Foss Tecator, Hoganas, Sweden) اندازه‌گیری و سپس پروتئین خام بااستفاده از فاکتور ٦/٢٩ محاسبه شد. میزان رطوبت با قرار دادن ۲ گرم نمونه در ظرف آلومینیومی از پیش وزن شده در آون (D-63450; Heraeus, Hanau, Germany) با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت تعیین و مقدار خاکستر نمونه‌ها با استفاده از کوره در دمای ٦٠٠ درجه سانتی-گراد به مدت ٤ ساعت سنجیده شد. میزان چربی کل نمونه‌ها با قرار دادن و هموژن کردن در حلال متانول:کلرفرم (۲:۱) تعیین گردید [۱۵].

به منظور تعیین ترکیب اسیدهای آمینه، ابتدا نمونه‌ها برای مدت ٢٤ ساعت در دمای۱۱۰درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسید هیدروکلریدریک ٦ نرمال هیدرولیز کامل شدند. سپس با استفاده از ماده او- فتالدیآلدهید[1] عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام [١٦] و میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[2] مدل کنوئر [3] آلمان انجام شدند.

۲-۵- معادلات ارزیابی ارزش غذایی پروتئین[۱۷]

۱- بازیافت نیتروژنی

در تحقیق حاضر میزان بازیافت نیتروژنی بر اساس معادله زیر بدست آمد. $(A \times B/C \times D) \times 100$ = بازیافت نیتروژن

A: میزان نیتروژن در کنسانتره پروتئین تولیدی، B: مقدار کنسانتره پروتئین تولیدی (۲۳گرم وزن خشک)

C: میزان نیتروژن در امعاء و احشاء صدف کلم، D: میزان امعاء و احشاء مورد استفاده (٣٦ گرم وزن خشک)

۲- نمره شیمیایی یا اسید آمینه

میزان نمره شیمیایی بر اساس معادله زیر بدست آمد.

نمره شیمیایی = اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین مورد آزمایش / اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین مرجع

پروتئین مرجع: پروفیل اسیدهای آمینه ضروری مورد نیاز برای انسان بالغ [۱۸] واسیدهای آمینه ضروری مورد نیاز برای کپور معمولی [۱۹].

۳- میزان کارایی پروتئین

یکی از مهمترین نمره و معیار برای ارزیابی پروتئین نرخ کارایی پروتئین (PER) است. محاسبه نرخ کارایی پروتئین با استفاده از قرار دادن میزان اسیدهای آمینه ضروری در معادلات ارائه شده در جدول ٤ انجام شد [۲۰].

۲-٦- الکتروفورز پروتئین در pH۱-۱۳

الکتروفورز کنسانتره پروتئینی در pH های مختلف با استفاده از ژل عمودی پلی اکلریل آمید با غلظت ۱۲٪ طبق روش

1.Phthaldialdehyde
2. HPLC
3. Knauer

Laemmli و همکاران [۲۱] انجام گرفت. نمونه‌ها (٤٠ میکروگرم پروتئین) با بافر (تریس اسیدی ۰/۱۲۵ مولار، SDS ٤٪، گلیسرول ۲۰٪ ، DTT ۰/۲ مولار و برموفنل آبی ۰/۰۲ ٪ در pH ٦/٨) به نسبت ۱:۱ مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند. از الکترود بافر حاوی تریس ۰/۳٪، گلایسن ۱/٤٤٪ و SDS ۰/۱٪ در pH ۸/۳ و الکتروفورز عمودی (SE 260, Hoefer, San Francisco,CA) برای الکتروفورز کردن استفاده شد. برای جداکردن باندهای پروتئین از ژل آکریل آمید ۱/۵ میلی‌متر و شدت جریان ۳۰ میلی آمپر برای هر ژل استفاده شد. باندهای پروتئین جداشده به مدت ۲ ساعت در محلول ۷٪ اسیداستیک، ۰/۵٪ رنگ کوماسی بلو R-250 و ٤٠٪ متانول رنگ آمیزی شدند. رنگ زدایی در محلول ٤٠٪ متانول و ۷٪ اسیداستیک انجام شد. ژل‌های تهیه شده با استفاده از اسکنر الکتریکی (Umax Power Look 2100, UMAX Technologies, Fremont, CA) عکس‌برداری شدند. استاندارهای مولکولی از لیزوزم[4] (14.4 kDa) ممانعت کننده تریپسین[5] (21.5 kDa)، کربونیک آنهیدراز[6] (31 kDa)، آلبومین[7] (45 kDa) ،آلبومین سرم[8] (66.2 kDa) و فوفریلاز[9] (97 kDa) تشکیل شده بود.

۲-۷- آنالیز آماری

داده‌های خام بعد ار بررسی نرمالیته و همگنی واریانس با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه مورد آنالیز قرار گرفت. از آزمون دانکن برای بررسی اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد. نتایج بصورت (میانگین±اشتباه معیار) بیان شد. برای بررسی آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و برای رسم نمودارها از Exell نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-حلالیت پروتئین

در فرایند تغییر pH (pH-shift) میزان پروتئین حل شده از ماده اولیه و حداکثر حلالیت ماده خام فاکتور مهمی می‌باشد. در این مطالعه کارایی این روش بر روی ضایعات صدف کلم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج میزان حلالیت پروتئین امعاء و احشاء صدف کلم در pH های اسیدی و قلیایی در نمودار ۱ آمده است. بر اساس نمودار بیشترین میزان حلالیت پروتئین در pH۱۱ بدست آمد که میران آن ۳٦/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. این نتیجه توسط ژل پلی آکریل آمید مورد تائید قرار گرفت (شکل ۲). بر اساس ژل پلی‌آکریل‌آمیدباندهای پروتئین مشاهده شد اما تفاوت معنی‌داری بین مقدار پروتئین محلول در pH ٤ و ۵ یافت نشد ($p<0.05$) (شکل ۱). این مشاهدات بیانگر این است که استفاده از این روش برای ضایعات صدف کلم مناسب است و نتایج دیگر محققین همانند مطالعه بر روی اسکوئید Jumbo [۲۲]، مطالعه بر روی Pacific whiting [۲۳]، مطالعه بر روی Rock fish [٢٤] و مطالعه بر روی گربه ماهی رودخانه‌ای [۲۵]) مشابه یافته تحقیق حاضر بود. حلالیت پروتئین در pHهای اسیدی و بازی با تغییر بار یونی به صورت مثبت یا منفی می‌باشد اما در نقطه ایزوالکتریک پروتئین هیچ گونه بار الکتریکی ندارد. منحنی حلالیت پروتئین نشان داد که pH برای حلالیت پروتئین در ادامه مطالعه مناسب می‌باشد.

در این مطالعه حداکثر بازیافت پروتئین در pH ۱۱ بدست آمد که معادل ٨٤٪ پروتئین از مواد خام ضایعات صدف کلم استخراج شد (جدول ۱). اما در pH اسیدی مقدار بازیافت پروتئینی قابل توجه نبود و قابل چشم پوشی بود. افزایش بار منفی در pH های قلیایی سبب جداسازی گروه‌های بازی از قبیل ایمدازول، گوانیدیل و زنجیره‌های ایسل از هیستدین، آرجنین و لیزین و همچنین جداسازی زنجیره فنولیکی (مثلاً در تیروزین) می‌شود. میزان پروتئین حل شده در pH ۱۱ (۹۳٪) مشابه نتایج حاصل از میزان پروتئین حل شده در ماهی هرینگ (*Clupea hareagus*) به میزان ۹۲٪ [٢٦]، پروتئین استخراج شده از عضلات اسکوئید به میزان ۸۵٪[۲۲] و ماهی صخره‌ای به میزان ۸۰٪[٢٤] می‌باشد.

4. lysozyme
5. trypsin inhibitor
6.carbonic anhydrase
7.ovalbumin
8.serum albumin
9.phophorylase

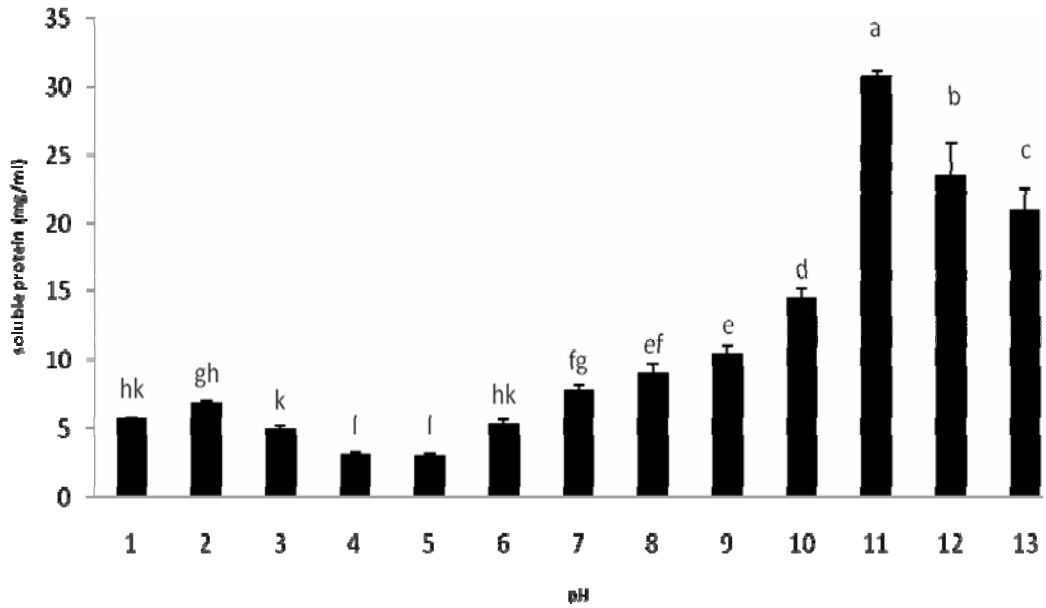

Fig 1) Effect of pH on solubility of proteins from Clam Viscera (*Megapitaria squalida*). Different letters indicate significant differences (P<0.05, Duncan' test).

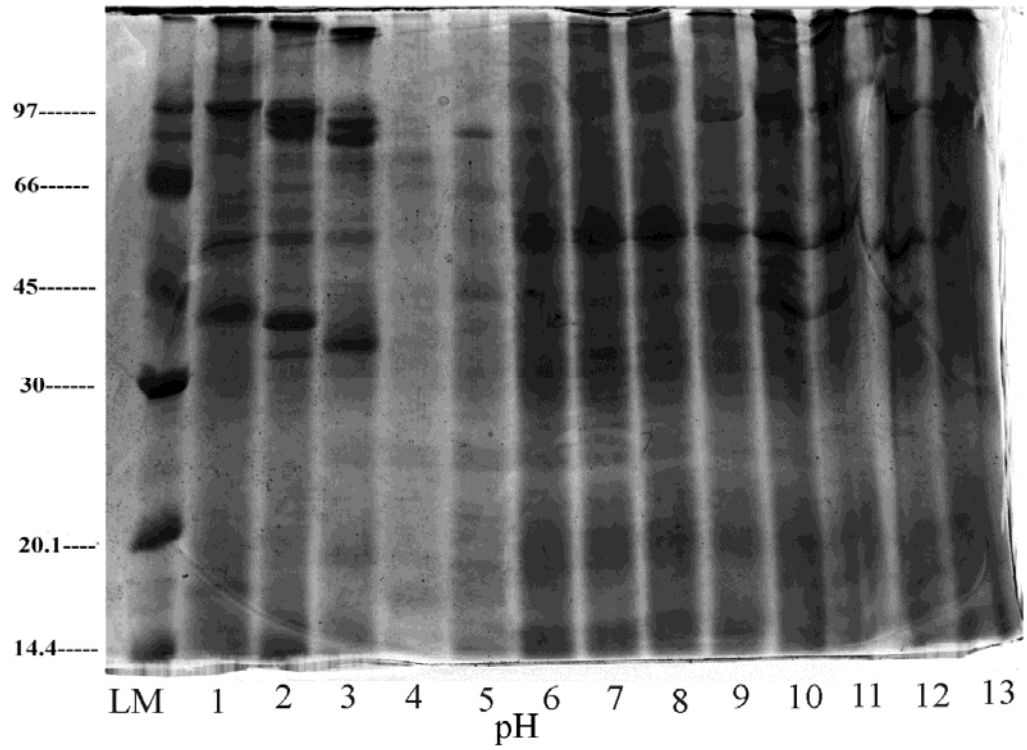

Fig 2) SDS-PAGE of proteins from Clam Viscera and the recovered fractions by the pH-shift method. (LM) molecular weight markers; lane 1-13) Clam Viscera adjusted to pH 1-13

Table 1 Protein yields from Clam Viscera using the alkaline (pH 11) recovery processes.

Process	Protein yields
Solubilized protein[1]	93 ± 0.19%
Precipitated protein[2]	89 ± 0.47%
Total protein recovery[3]	84 ± 0.3%

1. The amount of protein in pH11
2. The precipitated protein of first stage in iso-electrical point
3. Total protein that recovered from raw waste

با استفاده از این روش امکان حل کردن پروتئین در کوتاهترین زمان ممکن است. بنابراین این فاکتور یک مزیت در صنعت می باشد. با استفاده از روش تغییر pH پروتئین‌ها حداکثر در عرض ۱۰ دقیقه حل شده و تقریباً اکثر پروتئین‌ها در pH قلیایی حل می‌شوند [۲٤]. بعد از استخراج پروتئین در pH ۱۱، پروتئین‌های حل شده در pH ٤/٥ رسوب داده شدند. کارایی رسوب‌دهی در pH ٤/٥ در جدول ۱ نشان داده است. محصول در pH ایزوالکتریک به میزان ۸۹٪ رسوب داده شدند. این نتیجه بیانگر این است که اکثر پروتئین‌های محلول رسوب داده شدند. نتایج مشابه‌ای برای پروتئین‌های عضلات اسکوئید به میزان ۹۰/۸٪[۲۲] بدست آمده است. همچنین گزارش شده با استفاده از فرایند تغییر pH میزان محصول بدست آمده در عضلات ماهی به میزان ۸۵ ٪ می‌باشد [۲۷].

Table 2 Proximate composition (%) of raw material and protein concentrate of Clam viscera

Component	moisture	protein	ash	Lipid	fiber	Nitrogen recovery	Total essential amino acid(mg/g)
Raw material	10.17±0.06	64.82±0.27	27.36±0.18	0.78±0.01	0.3±0.01	-	580.20
Protein concentrate	8.74±0.1	72.74±0.2	11.26±0.1	5.75±	0.2±0.01	84%	663.23

۳-۲- ترکیب پروتئین در فرایند قلیایی:

مولکول‌های با وزن مولکولی پایین از قبیل آمونیاک و آمین‌ها، در آب بصورت محلول باقی مانده و در قسمت سوپرناتات حذف می‌شوند [۲۸]. با این کار کنسانتره پروتئینی تولید شده فاقد بو و مزه نامطبوع خواهد بود و کنسانتره پروتئینی در تهیه غذای دریایی بدون ایجاد بو مزه نامطبوع مفید خواهد بود. همچنین از کنسانتره تولیدی می‌توان به عنوان یک مکمل پروتئینی استفاده کرد. پروتئین‌های با وزن بیش از ٤٥ کیلودالتون در pH ۱ تا ۳ و pH تا ۱۲ فراوان هستند. در pH ٤ تا ٥ مقادیر پایینی از پروتئین یافت شد. نتایج ما مشابه نتایج بدست آمده توسط [۲۲] بود. همچنین این نتایج مطابق و منطبق با منحنی حلالیت پروتئین (شکل ۱) بود. در pH ٤ تا ٥ پروتئین محلول باقی مانده به احتمال زیاد پروتئین‌های سارکوپلاسمیک ضایعات صدف کلم می‌باشد [۲۷]. آنالیز پروتئین با ژل پلی‌آکریل‌آمید میزان بازیافت بالای پروتئین در pHهای بالای۱۰ را نشان داد. نتایج ما برای انتخاب یک روش ساده و ارزان قیمت می‌تواند بسیار مفید و سودمند باشد.

۳-۳- آنالیز تقریبی و اسیدهای آمینه

مقادیر پروتئین موادخام (امعاء و احشاء صدف کلم) و کنسانتره پروتئینی به ترتیب برابر با ٦٢/٨٢٪ و ٧٢/٧٪ بدست آمد. مقدار پروتئین مواد خام در نتیجه حاضر قابل مقایسه با دیگر مطالعات از جمله برای *Egreria radiate* به میزان ٦١٪[۲۹]، برای *Littorina littorea* به میران ٦٠/٩٪ و برای

Table 3) Amino Acid profile of raw material and protein concentrate of Clam viscera (mg AA/ g protein of materials) and chemical score in comparison with FAO/WHO reference

Chemical score of PC		Reference protein pattern		Protein Concentrate of Clam	Raw material (Clam Viscera)	Soy protein concentrate[1]	Amino acid (g AA/100g protein)
2[d]	1[c]	2[b]	1[a]				
-	-	-	-	9.10	8.19	-	ASPARTIC ACID
-	-	-	-	8.37	7.90	-	GLUTAMIC ACID
-	-	-	-	3.89	3.22		SERINE
-	-	2.1	1.6	nA	nA	1.82	HISTIDINE
-	-	-	-	7.43	6.33	-	GLYCINE
0.89	3.87	3.9	0.9	3.49	3.27	2.73	TREONINE
2.56	-	1.31	-	3.36	1.97	4.94	ARGININE
-	-	-	-	7.12	6.09	-	ALANINE
-	-	-	-	2.40	2.19	-	TIROSINE
-	-	3.6	1.3	nA	nA	3.38	VALINE
-	-	-	-	nA	nA	0.91	METHIONINE
0.31	-	6.5	-	2.05	2.05	3.45	PHYNILALANIN
1.43	2.76	2.5	1.3	3.60	3.41	3.19	ISOLEUCINE
1.44	2.50	3.3	1.9	4.76	4.31	5.20	LEUCINE
1.12	4.00	5.7	1.6	6.41	4.76	4.23	LYSINE
-	-	-	-	4.35	4.34	-	PROLINE
				260.67	219.61	-	ΣEAA(mg/g protein)
				402.56	360.69	-	ΣNEAA(mg/g protein)

1. data on as fed basis, NRC [19]
nA: not analyzed
[a]Suggested profile of essential amino acid requirements for adults FAO/WHO (1990)
[b]Essential amino acid requirements of common carp according to NRC [19]
[c]Chemical score calculated with FAO/WHO reference protein as the base [18]
[d]Chemical score calculated with amino acid requirements as per NRC [19]

Vivapara quadrata به میزان ٦٥/٣٪[٣٠] بود. مقادیر کل اسیدهای آمینه به ترتیب برای مواد خام (امعاء و احشاء صدف کلم) و کنسانتره پروتئینی به میزان ٥٨٠/٢٩ و ٦٦٣/٢٣ میلی گرم بر گرم پروتئین بدست آمد. براساس ترکیب پروتئین مواد خام، از ١٨ گرم (ماده خشک) ماده خام ١١/٧ گرم کنسانتره پروتئینی بدست آمد که از این مقدار ٩/٦٩ گرم به عنوان

محصول حاصل شد (مقدار بازیافت ۸۳٪) (جدول ۲). پروفیل اسیدهای آمینه ضایعات صدف کلم و کنسانتره پروتئینی حاصل شده و نمره شیمیایی محاسبه شده در جدول ۳ آورده شده است. نمره شیمیایی یک روش سریع برای تخمین ارزش غذایی پروتئین می‌باشد. با استفاده از این روش سطح اسیدهای آمینه در نمونه مورد آزمایش با پروتئین مرجع مورد مقایسه قرار می‌گیرد [۳۱]. در جدول ۳ اسیدهای آمینه آنالیز شده در کنسانتره پروتئینی بر اساس پروتئین مرجع مورد نیاز انسان [۱۸] و مورد نیاز کپور معمولی جوان [۱۹] مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. بر اساس مقایسه‌های صورت گرفته پروفیل اسیدهای آمینه کنسانتره پروتئینی ضایعات صدف کلم در مقایسه با پروتئین مرجع ۱ بجز برای اسیدآمینه متیونین (که در این مطالعه اندازه گیری نشد)، والین و هیستدین از میزان مطلوبی برخوردار بودند. نتایج مشابه‌ای نشان داده که در یک گونه‌ی دیگری از صدف کلم (*Egreria radiatea*) اسیدآمینه والین فاکتور محدود کننده بود. براساس پروتئین مرجع ۲ نیز بجز برای اسیدهای آمینه هیستدین، والین و متیونین بقیه اسیدهای آمینه در سطح تامین کننده نیازهای کپور معمولی [۱۹] بودند. نتایج مشابه‌ای در مورد محدود کننده بودن اسیدهای آمینه لیزین، فنیل آلانین و متیونین در محصولات بدست آمده است [۳۱].

نتایج نرخ کارایی پروتئین (PER) در جدول ٤ آورده شده است. ارزش PER در مطالعه حاضر بین ۲/۳۳ تا ۳/٥٤ برای کنسانتره پروتئین و ماده خام متغیر بود. این میزان برای کنسانتره پروتینی بالاتر بود و همچنین نتایج یکی از معادلات برای PER بالاتر از PER ثبت شده برای تخم مرغ به عنوان استاندارد (PER برابر ۳/٥) می باشد. چنین شاخص بالای نشان دهنده کیفیت بالقوه کنسانتره پروتئینی تولید شده به عنوان غذا می‌باشد. مقادیر PER مشابه (۲/۳۳ تا ۲/۳٦) برای *Egreria radiate*[۲۹] گزارش شده است. مقدار PERگزارش شده برای *Littorina littorea* و *Vivipara quadrata* به ترتیب ۰/۷ و ۱/۱ گزارش شده است [۳۲].

Table 4 Prediction equation for the calculation of protein efficiency ratio (PER) (%AA/ total AA)

Protein concentrate of Clam viscera	Raw material	Equation
3.543218	2.865716	-0.468 + 0.454(Leu) - 0.104(Tyr)
2.36619	2.370989	0.08084(X7)- 0.1094
2.330418	2.238079	0.06320(X10)- 0.1539

X7=Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+Lys;
X10=X7+His+Arg+Tyr

٤- نتیجه گیری نهایی

در تحقیق حاضر از روش pH-shift برای تهیه کنسانتره پروتئینی از امعاء و احشاء صدف کلم استفاده شد و براساس نتایج استفاده از شرایط قلیایی در pH برابر ۱۱ برای بازیافت پروتئین از ضایعات صدف کلم و تبدیل آن به یک ماده با ارزش افزوده بالا مفید می‌باشد. همچنین مقایسه ترکیب اسیدهای آمینه و کارایی پروتئین محصولی تولیدی با محصول استاندارد نشان داد که از محصول تولید شده می توان به مکمل غذایی در دام و غذای انسان استفاده کرد.

٥- منابع

[1] FAO, J., 2011. Food and Agriculture organization of the United Nations. Rome, URL: http://faostat. fao. org.

[2]Benjakul, S. and Morrissey, M.T., 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting

[13]Torten, J. and Whitaker, J., 1964. Evaluation of the Biuret and Dye-Binding Methods for Protein Determination in Meats. Journal of Food Science, 29(2): 168-174.
[14]AOAC, 1995. Association of Official Analytical Chemists. 16th (end), Procedure 984.
[15]Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. biol. Chem, 226(1): 497-509.
[16]Antoine, F., Wei C.I., Littell R.C. and M.R., M., 1999. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 5100–5107.
[17]Friedman, M., 1996. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(1): 6-29.
[18]Joint, F. and Organization, W.H., 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology: report of a joint FAO/WHO
[19]NRC, N.R.C.C.o.A.N., 1993. Nutrient requirements of fish. Course Technology.
[20]Alsmeyer, R.H., Cunningham, A. and Happich, M., 1974. Equations predict PER from amino acid analysis. Food Technology.
[21] structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. nature, 227(5259): 680-685.
[22]Palafox, H., Córdova-Murueta, J.H., Navarrete del Toro, M.A. and García-Carreño, F.L., 2009. Protein isolates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by pH-shift processing. Process Biochemistry, 44(5): 584-587.
[23]Choi, Y. and Park, J., 2002. Acid-Aided Protein Recovery from Enzyme-rich Pacific Whiting. Journal of Food Science, 67(8): 2962-2967.
[24]Yongsawatdigul, J. and Park, J., 2004. Effects of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfishmuscle proteins. Journal of food science, 69(7): 499-505.
[25]Kristinsson, H.G., Theodore, A.E., Demir, N. and Ingadottir, B., 2005. A Comparative Study between Acid-and Alkali-aided Processing and Surimi Processing for the Recovery of Proteins from Channel Catfish solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(9): 3423-3430.
[3]Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. and Lalitha, R.G., 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology, 99(2): 335-343.
[4]Saeedi, H. and Ardalan, A.A., 2010. Incidence and biology of *Arcotheres tivelae* (Crustacea: Decapoda) in *Amiantis umbonella* (Bivalvia: Veneridae) on the northern coast of the Persian Gulf, Iran. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 90(04): 655-661.
[5]Schweers, T., Wolff, M., Koch, V. and Sinsel Duarte, F., 2006. Population dynamics of *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae) at Magdalena Bay, Baja California Sur, Mexico. Revista de biología tropical, 54(3): 1003-1017.
[6]Wohlt, J., Petro, J., Horton, G., Gilbreath, R. and Tweed, S., 1994. Composition, preservation, and use of sea clam viscera as a protein supplement for growing pigs. Journal of animal science, 72(3): 546-553.
[7]Gnanasambandam, R. and Heitiarachy, N., 1995. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: Preparation and properties. Journal of food science, 60(5): 1066-1069.
[8]Bera, M. and Mukherjee, R., 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. Journal of food science, 54(1): 142-145.
[9]Wang, M., Hettiarachchy, N., Qi, M., Burks, W. and Siebenmorgen, T., 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(2): 411-416.
[10]Ovissipour, M., Kenari, A.A., Motamedzadegan, A. and Nazari, R.M., 2012. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food and bioprocess technology, 5(2): 696-705.
[11]Elango, R., Ball, R.O. andPencharz, P.B., 2009. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. Amino acids, 37(1): 19-27.
[12]Allowances, N.R.C.C.o.D., Food, N.R.C. and Board, N., 1980. Recommended dietary allowances, 2941. National Academies.

Muscle. Journal of food science, 70(4): 298-306.

[26]Undeland, I., Kelleher, S.D. and 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.

[27] Hultin, H., Kristinsson, H., Lanier, T. and Park, J., 2005. Process for recovery of functional proteins by pH shifts. Surimi and surimi seafood: 107-139.

[28]Lin, T.M. and Park, J.W., 1998. Solubility of salmon myosin as affected by conformational changes atvarious ionic strengths and pH. Journal of Food Science, 63(2): 215-218.

[29]Ifon, E. and Umoh, I., 1987. Biochemical and nutritional evaluation of *Egreria radiata* (clam), a delicacy of some riverine peasant populations in Nigeria. Food chemistry, 24(1): 21-27.

[30] Umoh, I. and Bassir, O., 1977. Lesser known sources of protein in some Nigerian peasant diets. Food Chemistry, 2(4): 315-321.

[31] Ovissipour, M. et al., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties ofprotein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus)* viscera. Food Chemistry, 115(1): 238-242.

[32]Umoh, I., Ayalogu, E. and Bassir, O., 1980. Evaluation of the nutritive value of some lesser known protein sources in Nigerian peasant diets. Ecology of Food and nutrition, 9(2): 81-85.

Proteins concentrate production of Clam offal, *Megapitaria squalid*, and some of its chemical properties

Ahmadifard, N. [1*], Humberto Cordova Murueta, J.[2]

1. Department of Fisheries, Faculty of natural resources,Urmia University, Urmia, Iran
2. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Mexico

(Received: 2016/01/31 Accepted: 2015/11/13)

Due to the growing interest for animal protein, production of high value-added products from waste, in terms of nutritional value, is more important. The *Megapitaria squalid* is important in terms of nutritional value. In this study, clam offal for protein extraction and evaluation of them in term of protein solubility, nitrogen recovery and chemical composition at room temperature using changes in pH was studied. The basis is on, protein extraction at alkaline and acidic conditions then precipitation at the isoelectric point. Based on the results about 93% of offal initial proteins were resolved at pH 11. Protein precipitation and protein recovery of raw materials was respectively 89% and 84% of the initial protein of offal. The protein solubility of raw materials at alkaline and acidic pH using polyacrylamide gel was evaluated. The result of gel was also confirming the results of the high solubility of the protein at alkaline pH. The amounts of protein and amino acids in the protein concentrate obtained by 72.7% and 663.23 milligrams per gram (dry weight basis), respectively. This study showed that the use of alkaline conditions at pH 11 for protein recovery of Clam waste and conversion into a high value-added material is useful. Finally, the product can be used as a food supplement in animal and human food.

Key word: Proteins concentrate, Offal, *Megapitaria squalid*, Chemical properties

*Corresponding Author E-Mail Address: n.ahmadifard@urmia.ac.ir