بهینه‌سازی فرآیند تولید پروتئین هیدرولیز شده از آب پنیر با استفاده از آنزیم آلکالاز

شیما پیری قشلاقی، علیرضا صادقی ماهونک[۲*]،محمد قربانی[۲]، مهران اعلمی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار دانشکده علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰٤/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۰۷)

چکیده

پپتیدهای زیست فعال اجزاء پروتئینی هستند که در ساختار پروتئین اصلی غیر فعال بوده و بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی، عملکردهای فیزیکوشیمیایی متعددی از خود بروز می‌دهند. در این پژوهش از روش آماری سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط فرآیند هیدرولیز پروتئین آب پنیر با استفاده از آنزیم آلکالاز استفاده شد. فاکتورهای مورد بررسی در این تحقیق دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بودند که برای رسیدن به بیشترین میزان درجه هیدرولیز این متغییرها در محدوده‌ی دمای ۵۲-٤۳ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۷۵-٦۵ دقیقه و مقدار آنزیم۹۰-٤۵ (واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) انتخاب شدند. آزمایشات بر اساس طرح مرکب مرکزی انجام شد. اثر متغییرهای واکنش برروی درجه هیدرولیز معنی‌دار شد ($P<$ ۰/۰۵). شرایط بهینه برای رسیدن به بیشترین میزان درجه هیدرولیز شامل دمای ٤۹/۰۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۷٤/۲۸ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ۹۰ (واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) به‌دست آمد و تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز ٤۱/۵۷ درصد حاصل شد. ضریب رگرسیون (R^2) حاصل برای مدل ارائه شده (از نوع درجه دوم) ۰/۹۵ بود. این مقادیر بیانگر دقت بالای مدل برای پیش بینی شرایط واکنش با متغییرهای مختلف می‌باشد.

کلید واژگان: آب پنیر، بهینه‌سازی، پروتئین هیدرولیز شده، روش سطح پاسخ، هیدرولیز آنزیمی.

* مسئول مکاتبات: sadeghiaz@gau.ac.ir

۱- مقدمه

عمل هیدرولیز را می‌توان شکسته شدن شیمیایی یا آنزیمی پروتئین‌ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی مختلف تعریف نمود. پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان اجزاء پروتئینی مورد بررسی قرار می‌گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی، عملکردهای فیزیکوشیمیایی متعددی از خود بروز می‌دهند. این پپتیدها در اندازه‌های ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه و جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشند [۱]. تحقیقات نشان می‌دهد که خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده، بستگی زیادی به نوع سوبسترا (ماده خام اولیه)، شرایط هیدرولیز (دما، زمان، pH) و نوع آنزیم دارد [۲]. روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی جهت تولید پروتئین هیدرولیزشده به‌کار گرفته می‌شوند. هیدرولیز آنزیمی به نوعی یک روش امیدبخش برای آینده محسوب می‌شود زیرا باعث تولید محصولاتی با خواص کاربردی بالا و ارزش تغذیه‌ای مطلوب می‌گردد [۳]. آنزیم‌های مورد استفاده به‌منظور هیدرولیز آنزیمی، مانند پاپائین[1] می‌تواند دارای منشاء گیاهی و یا پپسین[2] و کموتریپسین[3] با منشاء جانوری باشند. آنزیم‌های با منشاء میکروبی نیز به صورت گسترده کاربرد دارند. درمقایسه با آنزیم‌های با منشاء گیاهی و جانوری، آنزیم‌های میکروبی دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می‌توان به تنوع خواص پروتئولتیکی و پایداری بیشتر در pH و دماهای مختلف اشاره نمود. به طور کلی آنزیم Alcalase® 2.4 Lبه‌دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاه‌تر، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است [۳]. یکی از جدیدترین فن‌اوری‌ها برای تولید فرآورده‌هائی با ارزش افزوده که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته تولید پروتئین هیدرولیز شده از منابع مختلفی نظیر احشاء تاس ماهی ایرانی [٤]، ماهی سالمون [٥] ، ماهی گوازیم با استفاده از آنزیم آلکلاز [٦] و فراورده‌های جانبی صنایع گوشت (شامل امعاء و احشاء گوسفند) با استفاده از آنزیم پروتئاز قارچی [۷] ، گوشت میگو با استفاده از دو نوع آنزیم تریپسین و کیموتریپسین [۸] ، تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات کارخانه کنسرو ماهی تون توسط آنزیم تجاری یومامیزایم[۹] می‌باشد .پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به‌منظور کاربردهای متنوعی مانند مکمل‌های پروتئینی، محیط کشت باکتریایی، پایدارکننده‌ی نوشابه‌ها و طعم‌دهنده در صنایع شیرینی‌سازی تولید شود. براساس ویژگی‌های ساختاری و ترکیب آمینواسیدی، آن‌ها نقش‌های متعددی نظیر مهارکنندگی عناصر کمیاب، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش‌دهندگی کلسترول و فعالیت ضدفشار خون بالا از خود نشان می‌دهند. با این حال پپتیدهای متعددی یافت شده‌اند که عملکردهای چندگانه از خود بروز می‌دهند [۱]. آب پنیر یکی از محصولات جانبی کارخانجات لبنی است که به مقدار فراوان و با هزینه پایین تولید می‌شود و دارای خواص تغذیه‌ای، عملکردی و بیولوژیکی بالا می‌باشد. پروتئین آب پنیر دارای غلظت بالایی از اسیدهای آمینه زنجیره‌ای منشعب (BCAAs) لوسین، ایزولوسین و والین است که فاکتورهای مهمی در رشد و ترمیم بافت می‌باشند و نیز غنی از آمینواسیدهای حاوی سولفور یعنی سیستئین و متیونین است که عملکرد ایمنی بدن را از طریق تبدیل درون سلولی به گلوتاتیون افزایش می‌دهند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن از اسید آمینه سیستئین که در سنتز گلوتاتیون (GSH) شرکت می‌کنند ناشی می‌شود [۱۰]. ترکیب دیگری که در آب پنیر موجود است تریپتوفان است که موجب افزایش سطح سروتنین موجود در مغز شده و در نتیجه موجب کاهش استرس اشخاص

1. Papain
2. Pepsin
3. Chymotrypsin

می‌شود [۱۱]. روش سطح پاسخ، روشی مفید است که جهت بهینه‌سازی فرایندهای غذایی به‌کار گرفته می‌شود [۱۲]. تجزیه و تحلیل سطح پاسخ اثرات مابین متغیرهای مستقل را به‌تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می‌نماید. به‌علاوه این روش می‌تواند مدلی ریاضی که دقیقا کل فرایند را توصیف کند را ایجاد نماید [۱۳]. بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند باعث صرفه جویی در زمان، هزینه و میزان آنزیم مورد استفاده گردد. به همین منظور تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی شرایط (دما، زمان و میزان فعالیت آنزیم) تولید پروتئین هیدرولیز شده از ایزوله پروتئین آب پنیر، به‌منظور به‌دست آوردن درجه هیدرولیزاسیون بهینه انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی از آنزیم آلکالاز با فعالیت مشخص ۲/٤ واحد آنسون بر گرم (یک واحدآنسون عبارت است از میزان آنزیم مورد نیاز برای آزادشدن یک میلی‌اکی‌والان اسیدآمینه تیروزین ازسوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH=۷/۵) و دانسیته‌ی ۱/۱۸ گرم بر میلی‌لیتر که یک اندوپروتئیناز[4] گرفته شده از باکتری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* می‌باشد استفاده شد [١٤]. این آنزیم از شرکت سیگما (اسپانیا) تهیه شد و تا زمان آزمایش در ٤ درجه سانتی-گراد نگهداری‌گردید. ایزوله پروتئین آب پنیر در آبان ۱۳۹۲ از کارخانه پگاه مشهد تهیه گردید. فروزین[5]، فری سیانید پتاسیم، تری‌کلرواستیک اسید، کلریدآهن، اتانول، تریس[6]، اسید هیدروکلریدریک، اسید آسکوربیک از شرکت مرک، مونوسدیم فسفات و دی سدیم فسفات و اسید سولفوریک، هگزان و سود پرک از شرکت‌های معتبر داخلی تهیه گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه‌ی آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۲- تهیه پروتئین هیدرولیزشده‌ی ایزوله پروتئین آب پنیر

ابتدا نمونه‌ی ایزوله با بافر تریس- اسیدکلریدریک به نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۵ و با آب به نسبت ۱ به ۲۰ به حالت سوسپانسیون یکنواخت و با pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آلکالاز در آمده (pH = ۸) و سپس در دمای آزمایش آنزیم براساس فعالیت تعریف شده به سوسپانسیون اضافه شد. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری در انکوباتور شیکردار (ساخت کره جنوبی، شرکت ویژن[7] مدل VS-8480) و با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای مورد نظر برای هر تیمار انجام شدند. در انتهای هر تیمار به‌منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن آنزیم واکنش آنزیمی با حرارت دادن سوسپانسیون در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه به اتمام رسیده و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ به سرعت سرد گردید و در انتها در سانتریفیوژ یخچال‌دار (ساخت کره جنوبی، شرکت هانیل[8]، مدل Combi - 514R) با دور g ×٦٧٠٠ در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جهت جمع‌آوری سوپرناتانت قرار گرفت [۱۵]. به‌منظور یافتن دامنه‌ی مناسب شرایط هیدرولیز جهت بهینه‌سازی، ابتدا پیش‌تیمارهایی در شرایط مطابق با دماهای ٤۰، ٤۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه و فعالیت‌های آنزیمی ۳۰، ٦۰ و ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین صورت پذیرفت.

1. Endoproteinase
2. Ferrozine
3. Tris
4. Vision
5. Hanil

۲-۳- اندازه گیری ترکیبات شیمیایی

به منظور تعیین رطوبت، ۵ گرم از نمونه روی ظرف آلومینیومی از قبل وزن شده قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲٤ ساعت قرار داده شدند تا این‌که وزن ظرف ثابت گردید [۱٦]. برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از روش کلدال ضریب نیتروژن ٦/۲۵ استفاده شد (ساخت آلمان، شرکت بهر، مدل S3) و میزان خاکستر نیز با قرار دادن نمونه خام در کوره الکتریکی (ساخت آلمان، شرکت نابرترم[9]، مدل FX118-30) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید [۱۷].

۲-٤- تعیین درجه‌ی هیدرولیز

درجه هیدرولیز یکی از فاکتورهای مهم در تعیین خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد و در واقع میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را در محصول هیدرولیز شده بیان می‌کند. درجه‌ی هیدرولیز براساس روش هویل و مریت در سال ۱۹۹٤ برآورد گردید [۱۸]. به حجم برابری از سوپرناتانت، تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد اضافه گردید و سپس در دور g ×٦۷۰۰ و دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه به منظور جمع‌آوری ترکیبات محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد سانتریفیوژ گردید. میزان نیتروژن با روش کلدال اندازه گیری و درجه‌ی هیدرولیز براساس فرمول زیر محاسبه گردید.

= درجه هیدرولیز (درصد)

۱۰۰× (کل نیتروژن در نمونه / میزان نیتروژن در TGA ۱۰ درصد)

۲-۵- بهینه سازی شرایط آزمایش

به‌منظور بهینه‌سازی درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیزشده آب پنیر، از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی با ۵ سطح و ٦ تکرار در نقطه مرکزی مورد استفاده قرار گرفت (α+ ، ۱+، ۰، ۱- و α-) (جدول ۱). تیمارهای آزمایش شده و طراحی آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده‌های آزمایشی به‌منظور انطباق مدل ریاضی، تعیین ضرایب رگرسیونی و تعیین معنی‌داری آزمون‌های آماری شرایط مدل و نیز ترسیم نمودارها و بهینه سازی توسط نرم افزار Design Expert[10] صورت پذیرفتند. تیمارهای آزمایشی به‌منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش‌بینی نشده در پاسخ‌های مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. مدل رگرسیونی چندجمله‌ای درجه‌ی دوم به منظور پیش‌بینی پاسخ، درنظر گرفته شد. مدل پیشنهادی برای پاسخ به صورت معادله زیر است.

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

که γ متغییر وابسته (درجه هیدرولیز) می باشد، β_0 ثابت بوده و β_i و β_{ii} و β_{ij} ثابت‌های برآورد شده توسط مدل هستند. x_i و x_j سطح متغیرهای مستقل هستند و آن‌ها به ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه‌ی دوم و متقاطع[11] متغیرهای X_1 ، X_2 و X_3 روی پاسخ می‌باشند. مدل، اثر هر متغیر را روی پاسخ ارزیابی می‌نماید [۱۹].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیبات شیمیایی مواد خام اولیه

در ابتدای آزمایش درصد رطوبت، خاکستر و پروتئین اندازه‌گیری و نتایج مربوطه در جدول ۳ آورده شده است.

1. Nabertherm

1. Design Expert, 6.0.2 trial, Stat-Ease Inc
2. Cross

Table 1 Independent variables and levels used to optimize degree of hydrolysis of whey protein hydrolysates

Levels					independent variables
+1.68	+1	0	−1	−1.68	
212/5	175	120	65	27/5	time (min)
55/07	52	47/5	43	39/93	Temperature (℃)
105/34	90	67/5	45	29/66	Enzymatic activity (Anson unit/kg protein)

Table 2 Coded and real levels of independent variables for central composite design degree of hydrolysis of whey protein hydrolysates

degree of hydrolysis(%)	Time (min)	Temperature (℃)	Enzymatic activity	Number of treatment	
34/29	0	0	0	1	1
33/38	0	0	0	2	2
27/55	0	−1/6818	0	3	3
11.3	−1	−1	−1		4
30	0	0	0		5
25/42	+1	+1	−1		6
41/85	0	0	+1/6818		7
35	+1	−1	+1		8
33/89	0	0	0		9
12/79	0	0	−1/6818		10
11	−1	+1	−1		11
38/07	+1/6818	0	0		12
12/35	−1/6818	0	0		13
22/16	+1	−1	−1		14
37/51	+1	+1	+1		15
33/86	0	0	0		16
23	−1	−1	+1		17
30/45	0	+1/6818	0		18
23/99	−1	+1	+1		19
36	0	0	0		20

اثرات عوامل مختلف شامل زمان، دما و فعالیت آنزیم بر درجه هیدرولیز در جدول ۱ نشان داده شده است. ضرایب رگرسیون چندگانه[12] از طریق روش حداقل مربعات[13] به منظور پیش‌بینی مدل چند جمله‌ای درجه دوم[14] برای متغیر پاسخ ایجاد شد و مدل پیشنهادی زیر ارائه گردید:

درجه هیدرولیز = -۲۹۱/۱۰۰۳۸ + (دما) ۱/۰۵۰۵۸ + (فعالیت آنزیم) – ۰/۰۰۱۹٤٤۹ – ۰/۰۰٥٦٦۳۸۷ ۱۰/٤۹٦۷٦ + (زمان) ۰/۲۸۸۳۹+

Table 3 Chemical composition of whey protein isolate (wet weight basis).

Composition (%)	whey protein isolate
Protein	82±0.39
Moisture content	13±0.33
Ash	2.6±0.18

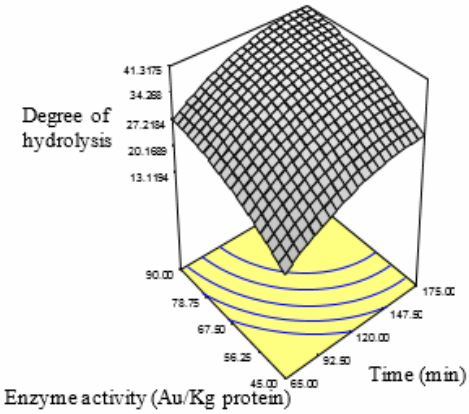
۳-۲- آنالیز سطح پاسخ

2. Multiple regression coefficients
3. Least-squares technique
4. Quadratic polynomial model

(فعالیت آنزیم × فعالیت آنزیم) (دما× دما) ۰/۱۱۲۲۶ – (زمان × + ۰/۰۰۲۵۶۵۶۶+ (دما× فعالیت آنزیم) ۰/۰۰۰۶۶۶۶۶ + زمان) (زمان× فعالیت آنزیم) ۰/۰۰۰۰۲۴۲۴۲۴ (دما× زمان)

تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) در مورد درجه هیدرولیز (جدول٤) نیز مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای درجه‌ی دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. R^2 =۰/۹۵۶۹ موید این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۵/۶۹ درصد از کل تغییرات در دامنه‌ی مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 معیاری است برای این‌که مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است [۲۰]. در موارد R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده که به ترتیب ۰/۹۵۶۹ و ۰/۹۱۸۱ به‌دست آمدند و گویای آن هستند که مدل برازش شده توصیف نسبتاً مناسبی از پراکندگی داده‌ها داشته است. مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که برای P> ۰/۰۵ معنی‌دار نبود. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده توانسته است که تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد [۲۱]، لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه‌ی متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. اهمیت متغییرهای مستقل بر درجه هیدرولیز به ترتیب روبرو رتبه‌بندی می‌شوند: زمان، فعالیت آنزیم، اصطلاح درجه دوم زمان (^{2}زمان)، اصطلاح درجه دوم فعالیت آنزیم (^{2}فعالیت آنزیم)، اصطلاح درجه دوم دما (^{2}دما)، دما، اثر متقابل دما × زمان، اثر متقابل فعالیت آنزیم × دما و اثر متقابل زمان × فعالیت آنزیم.

شکل‌های ۱ و ۲ اثر متقابل زمان و فعالیت آنزیم را برروی میزان درجه‌ی هیدرولیز نشان می‌دهد. مشخص است با افزایش زمان هیدرولیز درجه‌ی هیدرولیز در فعالیت آنزیمی ثابت افزایش می‌یابد که دلیل آن شکستن باندهای پپتیدی توسط آنزیم با گذشت زمان می‌باشد. نتایج مربوط به ارتباط فعالیت - آنزیمی با درجه‌ی هیدرولیز بیانگر افزایش درجه‌ی هیدرولیز با بالارفتن نسبت‌آنزیم به سوبسترا بوده که در تحقیق آسپمو و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز ثابت شده است به‌گونه‌ای که در بالاترین حد فعالیت‌آنزیمی انتخاب شده بیشترین درجات هیدرولیز مشاهده می‌گردد که در شکل ۱ و ۲ نیز شاهد چنین افزایشی با با افزایش میزان فعالیت آنزیم هستیم [١٤]. با افزایش زمان هیدرولیز از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته می‌شود این کاهش می‌تواند به‌علت کم‌شدن پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم و کم‌شدن فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم باشد. از سوی دیگر تشکیل ترکیبات ممانعت‌کننده[15] از فعالیت آنزیمی نیز، می‌تواند در این مورد اثرگذار باشند [۱۵و ۹]. دلیل انحنای سطح در شکل، معناداری فاکتورهای زمان × زمان و فعالیت آنزیم × فعالیت آنزیم می‌باشد (p<۰/۰۱) که در جدول تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مشاهده می‌شود.



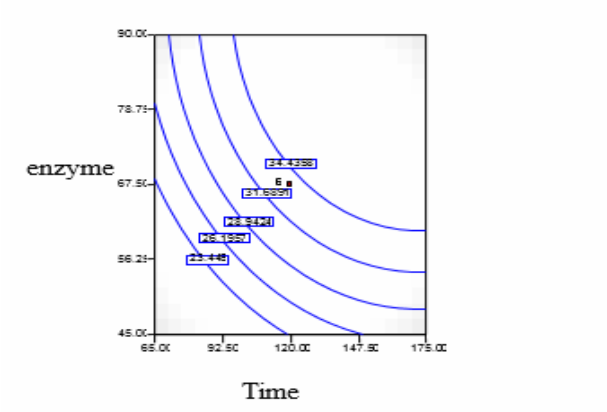


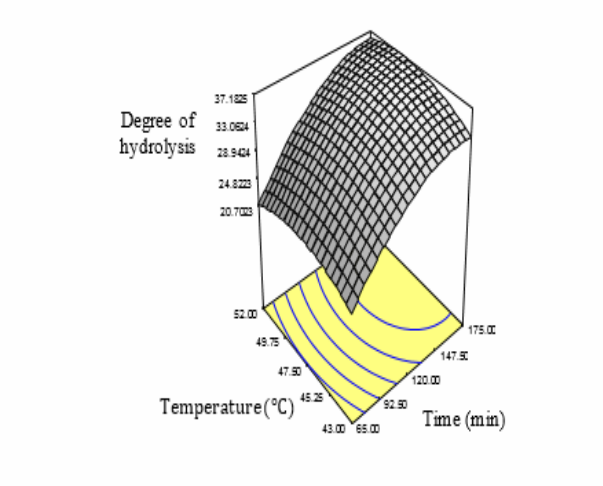
Fig 1&2 Effects of enzyme activity and hydrolysis time on degree of hydrolysis in three dimensional response surface plot.

1. Inhibitor

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) of response surface quadratic model for degree of hydrolysis

P	F	Mean square	Sums of squares	df	Source
<0/0001**	24/68	188/04	1692/34	9	Model
<0/0001**	85/02	647/77	647/77	1	Time
0/2924ns	1/24	9/41	9/41	1	Temperature
<0/0001**	93/23	710/33	710/33	1	Enzyme
0/0006**	24/7	188/16	188/16	1	Time*Time
0/0108*	9/78	74/48	74/48	1	Temperature*Temperature
0/0028**	15/55	118/48	118/48	1	Enzyme*enzyme
0/5299ns	0/42	3/23	3/23	1	Time *Temperature
0/9462ns	0/004784	0/036	0/036	1	Temperature*Enzyme
0/9761ns	0/000945	0/0072	0/0072	1	Enzyme*Time
		7/62	76/19	10	Residual
0/1316ns	2/93	11/36	56/8	5	Lack of fit
		3/88	19/39	5	Pure error
			1768/53	19	Total

* and ** significant probability level of 5% and 1% - ns: not significant



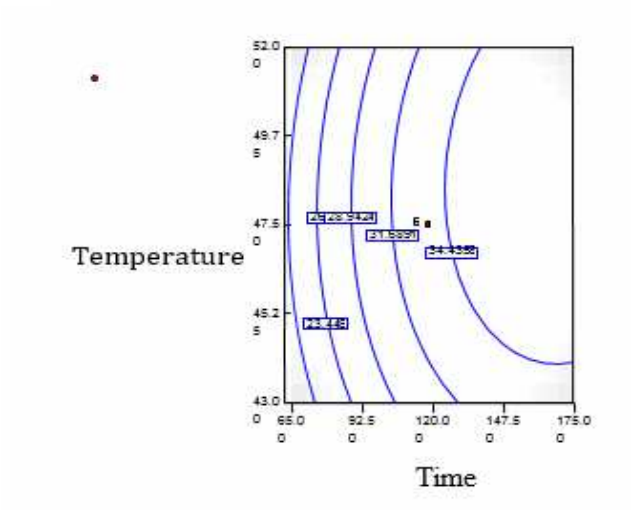


Fig 3&4 Effects of hydrolysis temperature and time on degree of hydrolysis activity in three dimensional response surface plot.

اثر متقابل زمان و دما، بر روی میزان درجه‌ی هیدرولیز در شکل‌های ۳ و ٤ نشان داده شده است، با افزایش زمان در دمای ثابت بر میزان درجه‌ی هیدرولیز به‌ویژه در دماهای نزدیک به بهینه افزوده می‌شود، همچنین که در یک زمان ثابت، افزایش دما منجر به افزایش درجه‌ی هیدرولیز می‌گردد. علت آن را می‌توان به از هم گسستن پیوندهای بین پپتیدها و تبدیل آن‌ها به پپتیدهای کوچکتر با افزایش دما دانست. اویسی‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۰ به روندی مشابه با این تغییرات در بهینه‌سازی درجه‌ی هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی تون باله زرد توسط آنزیم آلکالاز دست یافته‌اند. آن‌ها دریافتند که در یک زمان ثابت، افزایش دما منجر به افزایش درجه‌ی هیدرولیز گردیده است [۳].

در شکل‌های ۵ و ٦ که تغییرات درجه‌ی هیدرولیز در دماها و فعالیت‌های آنزیمی را نشان می‌دهند مشخص است که با افزایش فعالیت آنزیمی در یک دمای ثابت بر میزان درجه‌ی هیدرولیز افزوده می‌شود و این روند در دماهای میانی مشخص‌تر است. نتایج باتیستا و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز تایید کننده این نتایج می‌باشد آن‌ها نیز گزارش کردند که افزایش در میزان فعالیت آنزیمی منجر به افزایش درجه‌ی هیدرولیز شده اما از نرخ هیدرولیز کاسته خواهد شد [۲۲]

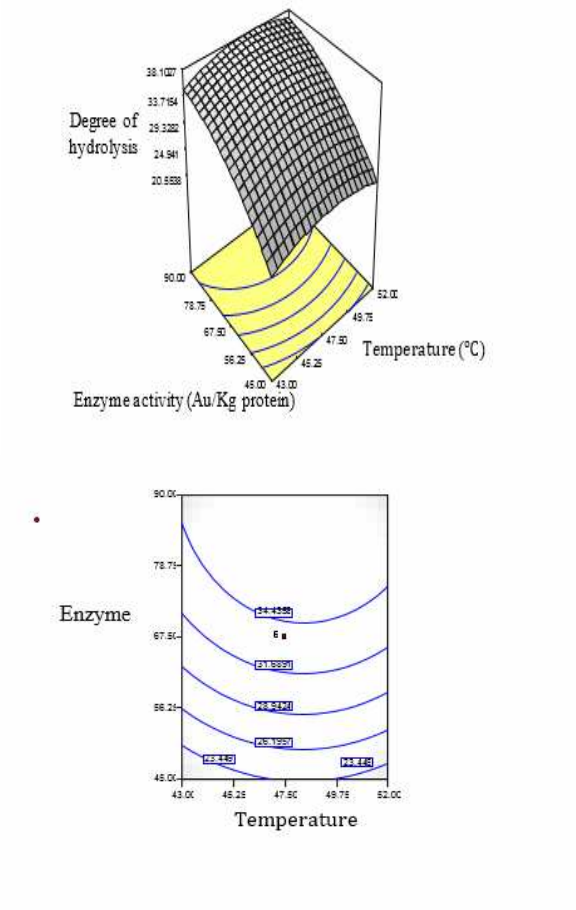


Fig 5&6 Effects of enzyme activity and hydrolysis temperature on degree of hydrolysis activity in three dimensional response surface plot.

۳-۳- بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز و ارزیابی اعتبار مدل

شرایط بهینه‌ی هیدرولیز برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، مطابق با دمای ٤٩/٠٢ درجه سانتی‌گراد، زمان ١٧٤/٢٨دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ٩٠ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین به‌دست آمد که با درجه‌ی مطلوبیت[1] ٩٩/١ درصد منطبق با درجه‌ی هیدرولیز ٤١/٥٧ درصد بود. به‌منظور تأیید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، در شرایط پیش‌بینی‌شده توسط مدل هیدرولیز (در سه تکرار) انجام گرفت که درجه‌ی هیدرولیز در این شرایط ٤١/١٣ درصد به دست آمد. انطباق مقادیر آزمایشی با مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل مؤید شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه‌ی بهینه‌ی هیدرولیز از ایزوله پروتئین آب پنیر می‌باشد.

1. Desirability

٤- نتیجه گیری کلی

تولید پروتئین هیدرولیز شده چندین هدف را دنبال می‌کند که از عمده‌ترین این‌ها، استفاده‌ی بهینه از بخش پروتئینی مواد غذایی، افزایش جذب و هضم این ترکیبات از طریق کاهش اندازه‌ی آن‌ها و افزایش ارزش غذایی و خواص زیستی آن‌ها می‌باشد. پیشرفت در تکنولوژی تولید پروتئین هیدرولیز شده امکان استفاده‌ی مناسب از منابع پروتئینی مختلف و غیر قابل دسترس را فراهم کرده است. هدف از این پژوهش یافتن مقادیر بهینه‌ی شرایط اثرگذار در هیدرولیز آنزیمی شامل دما، زمان هیدرولیز و فعالیت آنزیمی آنزیم آلکالاز بود. مطابق مدل ریاضی انجام گرفته بالاترین درجه هیدرولیر به میزان ٤١/٥٧ دزصد در شرایط بهینه‌ی هیدرولیز برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، مطابق با دمای ٤٩/٠٢ درجه سانتی‌گراد، زمان ١٧٤/٢٨ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ٩٠ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین به‌دست آمد که در مقایسه با محققین پیشین مقدار بالایی می‌باشد.

٥- منابع

[1] Sarmadi, B. H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. Peptides, 31: 1949-1956.

[2] Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. (2000a). Fishprotein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in FoodScience and Nutrition, 40(1): 43-81.

[3] Ovissipour, M. R., AbedianKenari, A., Motamedzadegan, A. and Nazari, R. M. (2010). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (Thunnusalbacares). Food and Bioprocess Technology, 5: 696-705.

[4] Ovissipour, M. R., Abedia, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco,B., Safari, R. and 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.

[5] See, S. F., Hoo, L. L. and Babji, A. S. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (Salmo salar) skin by Alcalase. International Food Research Journal. 18(4): 1359-1365.

[6] Normah, I., Jamilah, B., Saari, N. and Chemanyaakob, B. (2004). Optimization of hydrolysis conditions for the production of threadfin bream (Nemipterus japonicus) hydrolysate by alcalase. Accepted for Publication July 1.

[7] Bhaskar, N., Modi,V. K., Govindaraju, K., Radha, C. and Lalitha, R. G. (2008). Utilization of meat industry by products:Protein hydrolysate from sheep visceral mass. Bioresource Technology, 98: 388–394.

[8] Simpson, B.K., Nayeri, G., Yaylayan, V., and Ashie, I.N.A. 1998. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Food Chemistry. 61: 131-138.

[9] Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercialneutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 19: 489–498.

[10] Walzem, R. L., DiUard, C. J. and German, J. B. (2002). Wliey components: millennia of evolution create functionalities formammaliannutrition: what we know and what we may be overlookins. Crif Rev FoodSeiNwir, 42: 353-375.

[11] Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., DeAndrade, T. G. and Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. PharmacolBiochemBehav, 54: 129-141.

[12] Sumaya-Martinezl, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa1, S. and Prado-Barragan, L. A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*). A study of hysolysis parameters using response surface methodology. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 98-104.

[13] Diniz, F. M. and Martin, A. M. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effect 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.

[14] Aspmo, S. I., Horn, S. J. and Eijsink, V. G. H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (Gadusmorhua L.) viscera. Process Biochemistry, 40: 1957–66.

[15] Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B. (2009b). Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (Acipenser persicus) visceral protein. Food and Bioprocess Technology, DOI 10.1007/ s11947- 009-0284-x.

[16] AOAC. (2005). Official methods of analysis (18th ed.). of Official Analytical Chemists.Washington, DC.

[17] AOAC. (2000). Official methods of analysis (17th ed.). Washington DC: Association of Official. AOAC. Official methods of analysis (18th ed.).

[18] Hoyle, N. T. and Merritt, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysate from Herring (Clupeaharengus). Journal of Food Science, 59: 76-79.

[19] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. and Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76: 965–977.

[20] Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Habibi-Rezaei, M. (2011a). Poultry By-Products and Enzymatic Hydrolysis: Optimization by Response Surface Methodology Using Alcalase® 2.4L.

[21] Taheri, A. (2011). Antioxidative properties of rainbow sardine (*Dussumieria acuta*) protein hydrolysate: optimization using response surface methodology. International Food Congress Novel Approaches in Food Industry, MAY 26-29, Pp: 39-43.

[22] Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M. and Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) byproducts and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochemistry, 45: 18-24.

Optimization of whey protein hydrolysate production process by alcalase enzyme

Piri, Sh. [1], Sadeghi Mahoonak, A. R. [2*], Ghorbani, M. [3], Alami, M. [3]

1. MSc. Graduate, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2.Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
(Received: 2014/07/05 Accepted:2014/12/28)

Bioactive peptides are considered specific protein fragments that are inactive within the sequence of the parent protein. After they are released by enzymatic hydrolysis, they may exert various physiological functions. In the present study, response surface methodology was used to optimize hydrolysis conditions for preparing protein hydrolysate from whey protein, using Alcalase 2.4L enzyme. The investigated factors were temperature, time and enzyme/substrate ratio which were selected in the range 43-52°C, 65-175 min and 45-90 AU/Kg protein, respectively to achieve maximum degree of hydrolysis. Experiments were designed according to the central composite design. Each of the studied variables had significant effect on degree of hydrolysis (p<0/05). The optimum conditions to achieve the highest degree of hydrolysis were temperature 49.02°C , time 174.28 min, and enzyme / substrate ratio 90AU/Kg protein. Under these conditions, hydrolysis degree was 41.57 %. Regression coefficient for, chariot models (Quadratic type) was, 0.95. The values indicated the high accuracy of the model to predict the reaction conditions for different variables.

Keywords: Whey Protein, Optimization, Protein Hydrolysate, RSM, Enzyme Hydrolysis.

*Corresponding Author E-Mail Address: sadeghiaz@gau.ac.ir