

## بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از محصولات جانبی صنایع گوشت به کمک روش سطح پاسخ

نسیم مشگین فر<sup>۱\*</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲</sup>، امان محمد ضیایی فر<sup>۳</sup>، محمد قربانی<sup>۲</sup> و مهدی کاشانی نژاد<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۷

<sup>۱</sup> دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان

<sup>۲</sup> دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان

<sup>۳</sup> استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان

\*مسئول مکاتبه: Email: nasimmeshginfar@gmail.com

### چکیده

در این پژوهش، از روش آماری سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط فرآیند هیدرولیز پروتئین روده و معده‌ی گوسفند با استفاده از آنزیم آلکالاز (2.4L) استفاده شد. فاکتورهای مورد بررسی جهت رسیدن به بیشترین میزان درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژن، دما (۴۳-۵۲°C)، زمان (۶۵-۱۹۰ دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (۵۰-۹۵ Anson Unit/kg protein) بودند. آزمایشات بر اساس طرح مرکب مرکزی انجام شد. اثر متغیرهای واکنش بر روی هر یک از پاسخ‌های آزمایش معنی‌دار شد ( $P < 0.05$ ). شرایط بهینه برای رسیدن به بیشترین میزان درجه هیدرولیز و بازیابی نیتروژن به ترتیب شامل دمای ۴۷/۱۷ و ۴۷/۵۶ درجه سانتیگراد، زمان ۱۵۸/۷۴ و ۱۵۳/۳۸ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ۷۸/۶۰ و ۷۶/۰۳ (Anson Unit/kg protein) به دست آمد و تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز و بازیابی نیتروژن به ترتیب ۳۶/۳٪، ۷۲/۶۷٪ به دست آمدند ضریب همبستگی ( $R^2$ ) حاصل برای هر یک از مدل‌های ارائه شده مربوط به درجه هیدرولیز، بازیابی نیتروژن (مدل‌ها از نوع درجه دوم بودند). این مقادیر بیانگر دقت بالای مدل برای پیش‌بینی شرایط واکنش با متغیرهای مختلف می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه‌ی شیمیایی پروتئین هیدرولیز شده، محتوی بالای پروتئین (۸۳/۷۸٪) و میزان بسیار کم چربی (۰/۳۴٪) در این محصول را نشان داد.

واژگان کلیدی: امعاء و احشاء، بهینه‌سازی، پروتئین هیدرولیز شده، روش سطح پاسخ، هیدرولیز آنزیمی

## مقدمه

فراورده‌های جانبی در فرایند کشتار دام ترکیباتی همچون، پوست، استخوان، خون و امعاء و احشاء و... می‌باشند. امعاء و احشاء در واقع مواد مازادی هستند که از ذبح دام حاصل می‌شوند و شامل اندام‌های درونی بدن همانند قلب، جگر، قلوه و به ویژه اعضا دستگاه گوارش (مانند معده و روده) می‌باشند. این مواد در گروه غذایی گوشت قرار می‌گیرند. امعاء و احشاء از نظر ترکیب با بافت ماهیچه یا همان گوشت تفاوت دارند. بافت عضلانی دیواره‌ی آن‌ها از جنس عضلات صاف بوده که از نظر ترکیب و ساختمان با عضلات مخطط مثل ماهیچه‌ها و عضله قلب متفاوت است. همچنین در ساختمان این مواد علاوه بر بافت عضلانی، لایه‌ای از جنس بافت همبند قرار دارد که رشته‌های کلاژن و الاستیک به وفور در این قسمت حضور دارند (مرکز مجازی پژوهش‌های راهبردی دامپزشکی ۱۳۸۹).

استفاده از آنزیم جهت هیدرولیز منابع پروتئینی از روش‌های جدید در بیوتکنولوژی غذایی به حساب می‌آید. همچنین هیدرولیز آنزیمی منابع پروتئینی ذکر شده، نوعی فرایند بازیافت پروتئین از این ترکیبات می‌باشد. یک ترکیب پروتئینی هیدرولیز شده مخلوطی از پپتیدها و اسیدهای آمینه‌ای می‌باشد که از انجام عمل هیدرولیز توسط آنزیم، اسید یا قلیا و یا تخمیر حاصل شده است (آلایز و همکاران ۱۹۹۴). پپتیدهای زیست فعال نیز تکه‌های شکسته شده‌ای از پروتئین هستند که در توالی اصلی پروتئینی خود به صورت غیر فعال بوده و پس از رها شدن از زنجیره پروتئینی فعالیت‌های بیولوژیکی مشخصی را از خود نشان می‌دهند. این پپتیدها اغلب از ۲ تا ۲۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و جرم مولکولی آن‌ها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشد (آلایز و همکاران ۱۹۹۴). ساختار و توالی اسیدهای آمینه تشکیل دهنده بر خصوصیات این ترکیبات زیست فعال تاثیر می‌گذارد و بر این اساس این پپتیدها نقش‌های بیولوژیکی مهمی را به صورت درون زیستی و برون زیستی ایفا می‌کنند که از

آن جمله می‌توان به فعالیت های ضد اکسیداسیون، ضد میکروبی، ضد سرطان و افزایش دهنده‌ی سیستم ایمنی بدن اشاره کرد. ویوکیو و همکاران (۲۰۰۱) ترکیبات پروتئینی هیدرولیز شده را بر اساس درجه هیدرولیز و نوع کاربرد به سه دسته اصلی طبقه بندی کردند، ۱- پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز پائین و ویژگی عملگری بالا. ۲- پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز متغییر که بیشتر به عنوان افزودنی و طعم دهنده در مواد غذایی کاربرد دارد. ۳- پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالا که بیشتر به عنوان مکمل غذایی و نیز در فرمولاسیون مواد دارویی استفاده می‌شود.

با توجه به مطالب بیان شده، این تحقیق با هدف تولید محصولی غنی از پروتئین با ارزش تغذیه‌ای بالا، با استفاده از فرایند هیدرولیز آنزیمی و بررسی اثر شرایط تولید (دما، زمان و میزان آنزیم) بر خصوصیات محصول (میزان درجه هیدرولیز و بازیابی نیتروژن)، انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

## مواد خام اولیه

به منظور هیدرولیز آنزیمی از معده و روده‌ی گوسفند استفاده شد. به همین منظور این مواد از کشتارگاه (جلین واقع در حوالی گرگان) تهیه گردید و پس از شستشوی کامل توسط آب پرفشار به آزمایشگاه تجزیه مواد غذایی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان، منتقل گردید و تا شروع آزمایش در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد.

## آنزیم

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی، از آنزیم آکالاز (2.L4)<sup>۱</sup> با منشاء میکروبی استفاده شد. این آنزیم از شرکت نوزایم (دانمارک) خریداری شد و تا شروع آزمایش در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد.

<sup>۱</sup>2/4 (Anson unit)/ml enzyme

**تهیه پروتئین هیدرولیز شده**

به منظور تهیه پروتئین هیدرولیز شده، نمونه‌های روده و معده‌ی فریز شده پس از یخ‌زدایی به قطعات کوچک بریده و توسط چرخ گوشت خانگی به صورت کامل چرخ شدند، سپس این مواد جهت کاهش مقدار چربی تحت فرایند چربی‌گیری قرار گرفتند، برای این منظور مخلوط چرخ شده ماده اولیه بلافاصله به اتوکلاو منتقل و در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. مخلوط استریل شده پس از سرد شدن در دمای محیط توسط مخلوط‌کن تا حد امکان همگن گردید و سپس در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار با دور  $6000\text{g}$ ، تحت نیروی گریز از مرکز قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ، مواد به سه فاز تقسیم شدند که فاز بالایی را چربی، فاز میانی را آب و فاز انتهایی را پروتئین تشکیل می‌داد. محتوی پروتئین جهت آزمایش‌های بعدی جمع‌آوری شد (بیهاسکار و همکاران ۲۰۰۸). پس از مرحله‌ی چربی‌گیری جهت انجام فرایند هیدرولیز نمونه‌های پروتئینی چربی‌گیری شده به میزان  $20\text{g}$  در ارلن‌های  $100\text{ml}$  با بافر Tris-HCl به نسبت ۱ به ۲ (ماده اولیه به بافر) مخلوط شدند (خانتافانت و همکاران ۲۰۱۱). سپس آنزیم آلکالاز در  $\text{pH } 8$  مناسب فعالیت آنزیم) به مخلوط اضافه شد. آنزیم در محدوده‌ی غلظتی بین ۵۰ تا ۹۵ واحد آنسون به ارلن‌های حاوی نمونه اضافه گردید. واکنش‌های هیدرولیز در انکوباتور لرزشی با سرعت ( $200\text{rpm}$ )، در محدوده‌ی دمایی بین ۴۳ تا ۵۲ درجه سانتیگراد و محدوده‌ی زمانی بین ۶۵ تا ۱۹۰ دقیقه انجام شدند (خانتافانت و همکاران ۲۰۱۱). محدوده‌های دما، زمان و غلظت آنزیم برای این آزمایش بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های اولیه‌ی جهت تهیه پروتئین هیدرولیز شده، تعریف شد. در انتها فعالیت آنزیم با حرارت دهی مخلوط هیدرولیز شده در حمام آب گرم در دمای  $85^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۰ دقیقه به اتمام رسید. دمای مخلوط با استفاده از حمام یخ کاهش یافت و در نهایت جهت به دست آوردن محلول پروتئین هیدرولیز شده،

نمونه به مدت ۲۰ دقیقه و دمای  $10^{\circ}\text{C}$  در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور  $6700\text{g}$  سانتریفیوژ شد (طاهری ۲۰۱۱). مایع رویی حاصل با استفاده از دستگاه خشک‌کن تصعیدی (با مدل اوپرون مدل اف دی بی ۵۵۰۳)، خشک گردید.

**اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی**

تعیین ترکیبات شیمیایی، شامل اندازه‌گیری رطوبت طبق روش استاندارد گوشت و فراورده‌های آن به شماره‌ی ۷۴۵، اندازه‌گیری خاکستر (AOAC ۲۰۰۸) اندازه‌گیری چربی طبق روش سوکسله و اندازه‌گیری پروتئین بر طبق روش کلدال بود (پروانه ۱۳۸۵).

**تعیین درجه 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. درجه هیدرولیز بر اساس روش هویل و مریت (۱۹۹۴) تخمین زده شد. حجمی از محلول ۲۰٪ تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) تهیه گردید و به میزان مساوی به مایع رویی اضافه شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $10^{\circ}\text{C}$  با دور  $6700\text{g}$  سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع‌آوری گردید. جهت اندازه‌گیری میزان ازت از روش کلدال استفاده شد. میزان درجه هیدرولیز طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$100 \times (\text{کل نیتروژن در نمونه‌ی هیدرولیز شده} / \text{نیتروژن محلول در } 10\% \text{ TCA}) = \text{درجه هیدرولیز}$

**بازیافت نیتروژن**

بازیافت نیتروژن یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود.

$$100 \times (A.B/C.D) = \text{بازیافت نیتروژن}$$

A: میزان نیتروژن محلول در پروتئین هیدرولیز شده

B: مقدار پروتئین هیدرولیز شده

C: میزان نیتروژن در امعاء و احشاء

D: میزان امعاء و احشاء هیدرولیز شده.

جدول ۱- سطوح انتخاب شده برای فاکتورها (درجه هیدرولیز و بازیابی نیترژن)

کد					نماد	متغیر مستقل
-α	-۱	۰	+۱	+α		
۴۱/۱۳	۴۳	۴۷/۵	۵۲	۵۳/۸۶	Temp	دما (°C)
۳۹/۱۲	۶۵	۱۲۷/۵	۱۹۰	۲۱۵/۸	Time	زمان (دقیقه) نسبت آنزیم به
۴۰/۶۸	۵۰	۷۲/۵	۹۵	۱۰۴/۳	E/S	سوپسترا (AU/kg protein)

α=۱/۴۱۴

جدول ۲- تیمارهای آزمایشی با طراحی مرکب مرکزی

نسبت آنزیم به سوپسترا	زمان (دقیقه)	دما (°C)	تیمار
-۱	-۱	-۱	۱
-۱	-۱	+۱	۲
-۱	+۱	-۱	۳
-۱	+۱	+۱	۴
+۱	-۱	-۱	۵
+۱	-۱	+۱	۶
+۱	+۱	-۱	۷
+۱	+۱	+۱	۸
۰	۰	-α	۹
۰	۰	+α	۱۰
۰	-α	۰	۱۱
۰	+α	۰	۱۲
-α	۰	۰	۱۳
+α	۰	۰	۱۴
۰	۰	۰	۱۵
۰	۰	۰	۱۶
۰	۰	۰	۱۷
۰	۰	۰	۱۸
۰	۰	۰	۱۹
۰	۰	۰	۲۰

## بهینه سازی شرایط آزمایش

به منظور بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده از روش سطح پاسخ با طراحی مرکب مرکزی استفاده شد. سه متغیر دما ( $X_1$ )، زمان ( $X_2$ ) و نسبت آنزیمی ( $X_3$ ) به عنوان متغیرهای مستقل در پنج سطح ( $+a, +1, 0, -1, -a$ ) مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول ۱). تیمارهای آزمایش شده و طراحی آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. درجه هیدرولیز و میزان بازیافت نیتروژن به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شدند و اثر هر یک از متغیرهای مستقل بر روی سطح این پاسخ‌ها بررسی شد.

## نتایج و بحث

## ترکیبات شیمیایی مواد خام اولیه و پروتئین

## هیدرولیز شده‌ی آن

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی ماده خام، ماده خام چربی‌گیری شده و پروتئین هیدرولیز شده در جدول ۳ ارائه شده است. این نتایج حاکی از افزایش بسیار زیاد میزان پروتئین در محصول هیدرولیز شده می‌باشد (۸۳/۷۸٪). این افزایش در واقع نوعی غنی سازی پروتئین به حساب می‌آید. نتایج سایر محققین نیز حاکی

از میزان بالای پروتئین در محصولات هیدرولیز شده‌ی پروتئینی می‌باشد (بیهاسکار و همکاران ۲۰۰۸، کریستینسون و همکاران ۲۰۰۰، اویسی‌پور و همکاران ۲۰۰۹). همچنین نتایج کاهش قابل توجه چربی را در محصول پروتئین هیدرولیز شده، نشان می‌دهد، که این موضوع می‌تواند به دلیل شکسته شدن باندهای پپتیدی و سانتریفیوژ نمونه‌ها باشد که باعث می‌شود در طی سانتریفیوژ با دور بالا، چربی به پروتئین‌های نامحلول متصل شده و همراه آن‌ها رسوب کند. مقداری از چربی نیز که به صورت یک لایه مجزا، پس از سانتریفیوژ بر روی سوپر ناتانت قرار گرفت، جدا گردید. نتایج سایر محققین نیز بیانگر مقادیر بسیار کم چربی در محصول هیدرولیز شده می‌باشد که برخی از آن‌ها میزان چربی محصول را زیر ۱٪ گزارش کرده اند (کریستینسون و همکاران ۲۰۰۰، سلیزیت و همکاران ۲۰۰۵ و اویسی‌پور و همکاران). میزان خاکستر در نمونه‌های هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه با اختلاف معنی داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). علت این امر می‌تواند به دلیل افزایش میزان ماده خشک و نیز کاربرد بافر برای ثابت نگه داشتن pH در طی واکنش باشد.

## جدول ۳- ترکیبات شیمیایی (بر حسب وزن خشک)

ترکیب شیمیایی	مواد اولیه تازه (امعاء و احشاء)	مواد اولیه چربی‌گیری شده	پروتئین هیدرولیز شده
رطوبت (%)	۸۴/۵ ± ۰/۳۵ <sup>a</sup>	۷۲/۵ ± ۰/۳۵ <sup>b</sup>	۸/۶۱ ± ۰/۰۵ <sup>c</sup>
چربی (%)	۴/۱۴ ± ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۲/۳۸ ± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۰/۳۴ ± ۰/۰۰۳ <sup>c</sup>
پروتئین (%)	۱۰/۳ ± ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۲۲/۵۵ ± ۰/۰۹ <sup>b</sup>	۸۳/۷۸ ± ۰/۳۴ <sup>c</sup>
خاکستر (%)	۰/۱۳۵ ± ۰/۰۰۵ <sup>a</sup>	۰/۱۷۳ ± ۰/۰۱۹ <sup>b</sup>	۷/۰۵ ± ۰/۰۸ <sup>c</sup>

اعداد نشان دهنده میانگین‌ها ± خطای معیار (SE) هستند.

حروف غیر مشابه در هر آزمایش بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد.

## آنالیز سطح پاسخ

نتایج تجزیه‌ی واریانس برای دو متغیر درجه هیدرولیز و بازیابی نیتروژن در جدول ۴ و نتایج مربوط به

ارزیابی هر یک از مدل‌ها در جدول ۵ ارائه شده است. (کلیه‌ی آزمایش‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد). نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که تاثیر هر یک از

هر یک از مدل‌ها با ارزش بسیار بالایی به دست آمد (۰/۹۸۸) و این حاکی از توانایی خوب مدل در پیش‌بینی شرایط واکنش می‌باشد. همچنین شاخص عدم تطبیق مدل با داده‌های آزمایشی (Lack of fitness) برای هر یک از مدل‌ها معنی‌دار نشد ( $p > 0.05$ ). و این بیانگر مناسب بودن مدل‌ها برای این آزمایش می‌باشد.

متغیرهای دما، زمان و میزان آنزیم، بر میزان پاسخ‌ها معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ). معادله های ۱ (مربوط به درجه‌ی هیدرولیز) و ۲ (مربوط به بازیابی نیتروژن)، نیز روابط بین پاسخ‌ها و پارامترهای هیدرولیز را نشان می‌دهند. این معادله‌ها بیانگر این هستند که رابطه‌ی بین درجه‌ی هیدرولیز و بازیابی نیتروژن با پارامترهای هیدرولیز از نوع درجه دوم می‌باشد. نتایج مربوط به جدول ۵ نشان می‌دهد که ضریب همبستگی ( $R^2$ ) برای

جدول ۴- ضرایب مدل برای درجه‌ی هیدرولیز و بازیافت نیتروژن

ضریب رگرسیون		
بازیافت نیتروژن	درجه هیدرولیز	
-۷۵۰/۱۶۵*	-۵۸۱/۵۵*	مدل
۲۹/۷۹*	۲۲/۷۷*	$X_1$ (دما)
۰/۶۵۲*	۰/۳۵۳*	$X_2$ (زمان)
۱/۷۳۰*	۱/۳۳*	$X_3$ (نسبت آنزیم)
-۰/۳۰۷*	-۰/۲۳۰*	$X_1^2$
-۰/۰۰۱*	-۰/۰۰۱*	$X_2^2$
-۰/۰۱۳*	-۰/۰۰۷*	$X_3^2$
-۰/۰۰۶*	-۰/۰۰۳*	$X_1X_2$
۰/۰۰۳	-۰/۰۰۷*	$X_1X_3$
۰/۰۰۰۱*	-۰/۰۰۱*	$X_2X_3$

\* $p < 0.05$

جدول ۵- نتایج تجزیه‌ی واریانس برای مدل‌های درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژن

بازیافت نیتروژن		درجه هیدرولیز		
عدد p	ضریب رگرسیون	عدد p	ضریب رگرسیون	
۰/۲۴۶		۰/۵۷۵		Lack of fitness
	۰/۹۸۶		۰/۹۸۸	$R^2$ -Pred
	۰/۹۹۵		۰/۹۹۶	$R^2$ -Adj

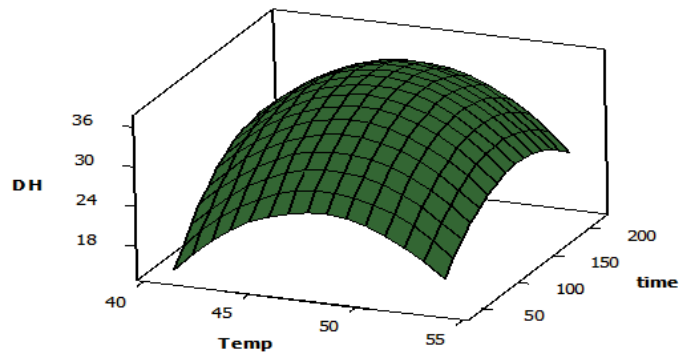
$$Y = -581/55 + 22/77X_1 + 0/35X_2 + 1/33X_3 - 0/23X_1^2 - 0/001X_2^2 - 0/007X_3^2 - 0/003X_1X_2 - 0/007X_1X_3 + 0/001X_2X_3$$

معادله ۱

$$Y = -750/16 + 29/79X_1 + 0/652X_2 + 1/73X_3 - 0/307X_1^2 - 0/001X_2^2 - 0/013X_3^2 - 0/006X_1X_2 + 0/0001X_2X_3$$

معادله ۲

مناسب از اثر متقابل دما و زمان به ترتیب شامل ۴۵ تا  $50^{\circ}\text{C}$  و ۱۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه می باشد. همچنین با توجه به شکل با افزایش زمان هیدرولیز، میزان درجه‌ی هیدرولیز و به نوعی شکستن باندهای پپتیدی افزایش یافت.



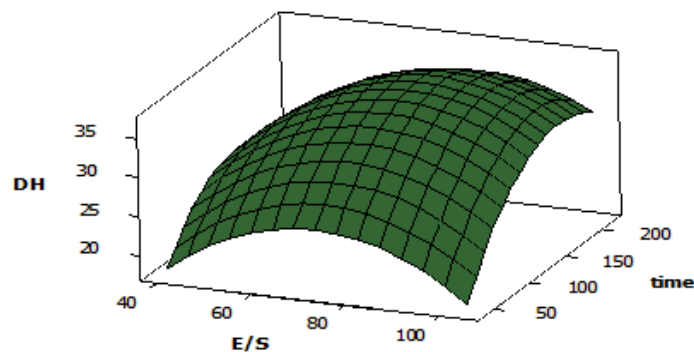
شکل ۱- اثر متقابل دما ( $^{\circ}\text{C}$ ) و زمان (دقیقه) هیدرولیز بر روی میزان درجه هیدرولیز (%)

تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی تون با استفاده از روش سطح پاسخ داشتند، گزارش کردند که با افزایش مدت زمان هیدرولیز، از شدت هیدرولیز کاسته شده و تقریباً ثابت می گردد.

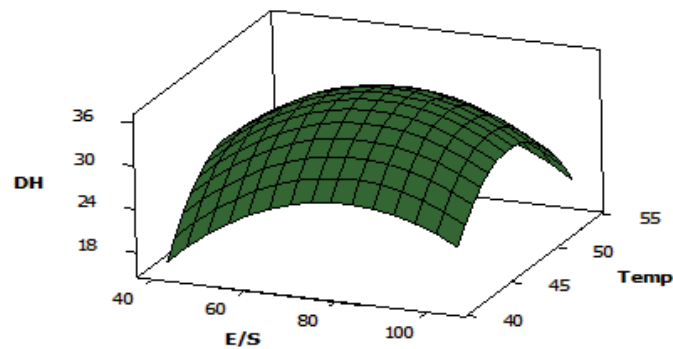
اثر متقابل دما و میزان آنزیم را بر میزان درجه هیدرولیز در شکل ۳ ارائه شده است (زمان در نقطه‌ی  $127/5$  ثابت و مرکزی، در نظر گرفته شد). با توجه به شکل با افزایش مقدار آنزیم بیشتر از ۹۰ واحد آنسون، از میزان درجه‌ی هیدرولیز کاسته می شود. همچنین شکل نشان می دهد که با افزایش دما بر شدت هیدرولیز افزوده می گردد ولی بعد از دمای  $50^{\circ}\text{C}$  نرخ رشد هیدرولیز کاهش یافت.

اثر متقابل زمان و دما، بر میزان درجه‌ی هیدرولیز در شکل ۱ ارائه شده است. این شکل نشان می دهد که میزان درجه‌ی هیدرولیز با ترکیب مناسب از دو فاکتور دما و زمان و در مقدار ثابت آنزیم،  $72/5$  واحد آنسون (نقطه‌ی مرکزی) تا مقادیر بیشتر از ۳۵٪ افزایش می یابد. ناحیه‌ی

شکل ۲ اثر متقابل زمان و میزان آنزیم را بر روی میزان درجه هیدرولیز نشان می دهد. با توجه به شکل برای افزایش میزان درجه‌ی هیدرولیز در دمای ثابت و مرکزی  $47/5^{\circ}\text{C}$ ، با افزایش زمان هیدرولیز بایستی میزان آنزیم را افزایش داد. این موضوع می تواند به دلیل تولید ترکیبات بازدارنده‌ی آنزیمی در زمان هیدرولیز و درجات هیدرولیز بالا باشد که به عنوان سوبسترای رقابتی با پروتئین‌های هیدرولیز نشده عمل می کنند و باعث کاهش و یا توقف اثر آنزیم بر روی سوبسترای اصلی می شوند (اویسی پور و همکاران ۱۳۸۹). طی تحقیق که اویسی پور و همکاران بر روی بهینه سازی



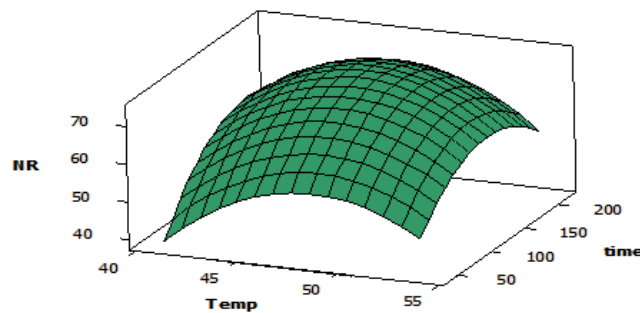
شکل ۲- اثر متقابل زمان (دقیقه) و میزان آنزیم (واحد آنسون) بر روی میزان درجه هیدرولیز (%)



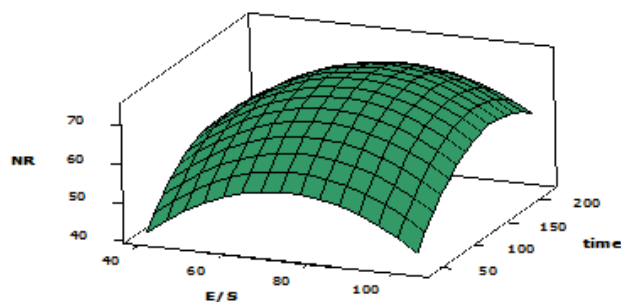
شکل ۳- اثر متقابل دما ( $^{\circ}\text{C}$ ) و میزان آنزیم (واحد آنسون) بر روی میزان درجه هیدرولیز (%)

به صورت قابل توجهی کاهش یافت. در محدوده‌ی آنزیم بین ۶۰ تا ۹۰ (AU/kg protin) بیشترین میزان بازدهی نیتروژن وجود دارد و با کاهش زیاد زمان هیدرولیز در این محدوده‌ی آنزیمی، درصد کمی از میزان بازدهی نیتروژن کاسته می‌شود. با افزایش مقدار آنزیم از این ناحیه، بازدهی نیتروژن افزایش نیافت و این موضوع با میزان درجه هیدرولیز همبستگی دارد.

شکل‌های ۴ و ۵ اثرات متقابل دما و زمان، زمان و میزان آنزیم را بر روی میزان بازیافت نیتروژن نشان می‌دهد. شکل‌ها نشان می‌دهند که یک ترکیب مناسب از عملکرد دما و زمان هیدرولیز در نسبت آنزیم ثابت، منجر به رسیدن به بالاترین میزان بازیافت نیتروژن می‌شود. این متغییر در بیشترین مقدار به ۷۳/۵٪ رسید. با کاهش زمان هیدرولیز به پائین‌تر از ۷۵ دقیقه میزان بازیافت نیتروژن



شکل ۴- اثر متقابل دما ( $^{\circ}\text{C}$ ) و زمان هیدرولیز (دقیقه) بر روی میزان بازیافت نیتروژن (%)



شکل ۵- اثر متقابل زمان (دقیقه) و میزان آنزیم (واحد آنسون) بر روی میزان بازیافت نیتروژن (%)



### بهینه سازی شرایط هیدرولیز و ارزیابی اعتبار مدل

بیشترین میزان پیش بینی شده توسط مدل برای درجه هیدرولیز و بازیابی نیتروژن به ترتیب ۳۶/۶۵٪ و ۷۳/۹۸٪ بود. شرایط بهینه ارائه شده توسط مدل برای درجه هیدرولیز دمای ۴۷/۱۷ °C، زمان ۱۵۸/۷۴ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۷۸/۶۰ (AU/kgprotein) و برای بازیافت نیتروژن به صورت دمای ۴۷/۵۶ °C، زمان ۱۵۳/۳ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۷۶/۰۳ (AU/kgprotein) می باشد. تهیهی پروتئین هیدرولیز شده در شرایط بهینه ارائه شده توسط مدل، به صورت آزمایشی انجام شد و نتیجه با مقدار پیش بینی شده توسط آن مقایسه گردید. نتایج حاصل از آزمایش های انجام شده در این شرایط برای میزان درجه هیدرولیز ۳۶/۳٪ و میزان بازیافت نیتروژن ۷۲/۶۷٪ به دست آمد. این نتایج بیانگر توانایی مناسب مدل در پیش بینی اثر سه متغیر دما، زمان و نسبت آنزیم بر فرایند هیدرولیز پروتئین می باشد.

### نتیجه گیری کلی

تولید پروتئین هیدرولیز شده چندین هدف را دنبال می کند که از عمده ترین 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 می باشد. پیشرفت در تکنولوژی تولید پروتئین هیدرولیز شده، امکان استفادهی مناسب از منابع پروتئینی مختلف و غیر قابل دسترس را فراهم کرده است. با توجه به پتانسیل بالای کشتار گوسفند و تولید گوشت گوسفند در داخل کشور و به همان میزان تولید بالای ضایعات و زوائد خوراکی و غیر خوراکی حاصل از کشتار که منابع غنی از پروتئین به حساب می آیند، در این پژوهش از امعاء و احشاء گوسفند به عنوان مادهی اولیهی پروتئینی جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده، استفاده شد. نتایج حاصل از بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده نشان می دهد که تولید این محصول به صورت موثری تحت تاثیر شرایط واکنش قرار دارد، در واقع هر یک از فاکتورهای دما، زمان و مقدار آنزیم تاثیر کاملا معنی داری بر کیفیت محصول دارند.

### منابع مورد استفاده

- اویسی پور م، عابدیانع، معتمدزادگان ع و نظری رم، ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئین های هیدرولیز شده یامعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacores*)، نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۶(۱).
- پروانه و، ۱۳۸۵. کنترل کیفی و آزمایش های شیمیایی مواد غذایی، موسسهی انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۳۳۲ ص.
- فراوری و نگهداری گوشت، ۱۳۸۹. www.hakimemehr.ir. ۱۳۹۱/۴/۲۹.
- بی نام، ۱۳۶۳. موسسهی استاندارد و تحقیقات ایران، استاندارد گوشت و فرآورده های آن، شماره ۷۴۵.
- AOAC. Official methods of analysis (18th ed), 2008. Association of Official Analytical Chemists Washagton, DC 47.
- Alaiz M, Beppu M, Ohishi, K and Kikugawa, K, 1994. Modification of delipidated apoprotein B of low density lipoprotein by lipid oxidation products in relation tomacrophage scavenger receptor binding. Journal of Biological Pharmaceutical Bulletin 17:7-51.
- Vioque J, Clemente A, Pedroche J, Yust MM and Millgn F, 2001. Obtencion y aplicaciones de hidrolizados proteicos. Journal of Grasas Aceites 52:132-6.
- Bhaskar N, Modi VK, Govindaraju K, Radha C and Lalitha RG, 2008. Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. Journal of Bioresource Technology 98:388-394.

- Khantaphant S, Benjakul S and Ghomi MR, 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Journal of LWT- Food Science and Technology 44:1139-1148.
- Taheri A, AbedianKenari A, Motamedzadegan A and Habibi Rezaie M, 2011. Optimization of goldstripe sardine (*Sardinella gibbosa*) protein hydrolysate using Alcalase 2.4L by response surface methodology. 1 J CyTA –Food 9: 114–120.
- Hoyle NT and Merritt JH, 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*) Journal of Food Science 59:76–79.
- Bhaskar N, Benila T, Radha C and Lalitha RG, 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Journal of Bioresource Technology 99:335–343.
- Kristinsson HG and Rasco BA, 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Journal of Food Science and Nutrition 40: 43–81.
- Ovissipour MR, Abedia AM, 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. Journal of Food Chemistry 115: 238–242.
- Slizyte R., Dauksas E., Falch E., Storro I., Rustad T. 2005. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. Journal of Process Biochemistry 40:2021–2033.

## Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology

N Meshginfar<sup>1\*</sup>, AR Sadeghi Mahoonak<sup>2</sup>, AM Ziaifar<sup>3</sup>, M Ghorbani<sup>2</sup> and M Kashaninejad<sup>2</sup>

Received: February 05, 2013 Accepted: March 18, 2014

<sup>1</sup>MSc Graduated, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

\*Corresponding author: E mail: nasimmeshginfar@gmail.com

### Abstract

In the present study, response surface methodology was used to optimize hydrolysis conditions of protein hydrolysate from the sheep visceral (stomach, intestine), using Alcalase 2.41. The investigated factors were temperature (43-52°C), time (65-190 min) and enzyme/substrate ratio (50-95 AU/Kg protein) to achieve maximum degree of hydrolysis and recovery of nitrogen. Experiments were designed according to the central composite design. Each of the studied variables had a significant effect on responses ( $p < 0/01$ ). The optimal conditions to achieve the highest degree of hydrolysis and recovery of nitrogen were, temperature (47.17, 47.56°C), time (158.74, 153.38 min), and enzyme/ substrate ratio (78.60, 76.03 AU/Kg protein), respectively. Under these conditions, hydrolysis degree, nitrogen recovery were 36.3%, 72.67%, respectively. Regression coefficient for each of the models (Quadratic type) for degree of hydrolysis, recovery of nitrogen were, 0.988, 0.986, respectively. The values indicated the high accuracy of the model to predict the reaction conditions considering different variables. The chemical analysis of protein hydrolysate showed high protein content (83.78%) and low fat content (0.34%).

**Keywords:** Sheep visceral, Optimization, Protein hydrolysate, Response surface methodology, Enzyme hydrolysis