

# بهینه‌سازی بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر با استفاده از روش سطح پاسخ

شیمای پیری قشلاقی<sup>a\*</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>b</sup>، مهران علمی<sup>b</sup>، محمد قربانی<sup>b</sup>

<sup>a</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
<sup>b</sup> دانشیار دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۶/۲۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۱

## چکیده

**مقدمه:** بازیافت نیتروژن یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود و در نتیجه میزان بازدهی فرایند در طی هیدرولیز آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می‌باشد. بهینه‌سازی بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیز شده، می‌تواند باعث صرفه جویی در زمان، هزینه و میزان آنزیم مورد استفاده گردد، این پژوهش نیز به منظور دستیابی به این اهداف صورت گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** 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 بازیافت نیتروژن این متغیرها در محدوده دمای ۴۳-۵۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۶۵-۱۷۵ دقیقه و مقدار آنزیم ۹۰-۴۵ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین انتخاب شدند. آزمایشات براساس طرح مرکب مرکزی انجام شد.

**یافته‌ها:** شرایط بهینه برای رسیدن به بیشترین میزان بازیافت نیتروژن شامل دمای ۴۷/۱ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۷۳/۲ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ۸۷/۹۸ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین به دست آمد و تحت این شرایط میزان بازیافت نیتروژن ۷۰/۶۶ درصد حاصل شد. ضریب رگرسیون ( $R^2$ ) حاصل برای مدل ارائه شده (از نوع درجه دوم) ۰/۹۷۴۷ بود. این مقادیر بیان گر دقت بالای مدل برای پیش‌بینی شرایط واکنش با متغیرهای مختلف می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** پیشرفت در تکنولوژی تولید پروتئین هیدرولیز شده امکان استفاده مناسب از منابع پروتئینی مختلف و غیر قابل دسترس را فراهم کرده است. پروتئین‌های هیدرولیز شده آب پنیر نیز به عنوان منبعی غنی از پپتیدهای سلامتی بخش با خواص عملکردی و سایر ویژگی‌های مطلوب، قابلیت کاربرد در فرمولاسیون‌های غذایی را دارند.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم آلکالاز، آب پنیر، بازیافت نیتروژنی، سطح پاسخ، هیدرولیز آنزیمی

## مقدمه

یکی از جدیدترین فن‌آوری‌ها برای تولید فراورده‌های با ارزش افزوده بالا هیدرولیز پروتئین می‌باشد و روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی جهت این منظور به کار گرفته می‌شوند. فرایند کاربرد آنزیم‌های تجاری به جای فرایندهای شیمیایی و یا آنزیم‌های داخلی دارای مزایای بسیار زیادی است، زیرا کل فرآیند هیدرولیز کاملاً تحت کنترل است و در نتیجه فرآورده‌های با خواص مشخص تولید می‌شود. آلكالاز یک آنزیم تجاری و قلیایی تولید شده از باکتری *Bacillus licheniformis*<sup>۱</sup> است که به صورت‌های Alcalase® 2.4 L FG، Alcalase® 2.4 AF و Alcalase® 2.4 L FG وجود دارد که از این سه نوع تنها Alcalase® 2.4 L FG دارای درجه غذایی<sup>۲</sup> بوده و در فرمولاسیون‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های غذایی روشی موثر در بازیابی پپتیدهای زیست فعال قوی می‌باشد. پروتئین‌های هیدرولیز شده ترکیباتی هستند با وزن مولکولی پایین که تحت عنوان پپتیدهای زیست فعال شناخته می‌شوند. این ترکیبات پس از ورود به بدن به آسانی جذب شده و نقش‌های بیولوژیکی مهمی را در سطوح سلولی ایفا می‌کنند. از مهم‌ترین عملکردهای این ترکیبات زیست فعال می‌توان به فعالیت‌های ضد اکسایش، ضد میکروبی، ضد سرطان و افزایش دهنده سیستم ایمنی بدن اشاره کرد (Vioque et al., 2001). پروتئین‌های شیر و سویا رایج‌ترین پروتئین‌های مورد استفاده برای هیدرولیز هستند. پروتئین‌های آب پنیر که حدود ۲۰ درصد از پروتئین‌های شیر گاو را تشکیل می‌دهند از نظر تغذیه‌ای بهتر از پروتئین‌های دیگر می‌باشند و دارای پپتیدهای زیست‌فعال کد شده در توالی خود هستند که هیدرولیز پروتئین اولیه این پپتیدها را آزاد می‌کند (Korhonen, 2009; Kim et al., 2007; Sinha et al., 2007; Pihlanto-Leppälä., 2001). این پروتئین‌ها 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 گلوپتاتین افزایش می‌دهند.

بهینه‌سازی بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر

فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن از اسید آمینه سیستئین که در سنتز گلوپتاتین (GSH) شرکت می‌کند ناشی می‌شود (Walzem et al., 2002). ترکیب  $\alpha$ -لاکتوآلبومین از آب پنیر نیز فلزات سنگین را شلاته می‌کند و استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد زیرا خاصیت شلاته‌کنندگی یون آهن را داراست (Ha & Zeniel, 2003). ترکیب دیگری که در آب پنیر موجود است تربیتوفان است که موجب افزایش سطح سروتین موجود در مغز شده و در نتیجه موجب کاهش استرس اشخاص می‌شود (Graeff et al., 1996). بازیافت نیتروژن یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود که بیان‌کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلول از انواع غیر محلول و در نتیجه میزان بازدهی فرایند در طی هیدرولیز آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می‌باشد (Liaset et al., 2002).

هدف از این تحقیق بهینه‌سازی بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیز شده، به‌منظور صرفه‌جویی در زمان، هزینه و میزان آنزیم مورد استفاده می‌باشد. در تحقیق حاضر تاثیر آنزیم آلكالاز، دماها و زمان‌های مختلف بر راندمان بازیافت پروتئینی ایزوله پروتئین آب پنیر مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### - مواد

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی از آنزیم آلكالاز با فعالیت مشخص ۲/۴ واحد آنسون بر گرم (یک واحد آنسون عبارت است از میزان آنزیم مورد نیاز برای آزاد شدن یک میلی‌اکی‌والان اسیدآمینه تیروزین از سوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و  $\text{pH} = 7/5$ ) و دانسیته ۱/۱۸ گرم بر میلی‌لیتر که یک اندوپروتئیناز<sup>۳</sup> گرفته شده از باکتری *Bacillus licheniformis* فورمیس می‌باشد استفاده شد (Aspmo et al., 2005). این آنزیم از شرکت سیگما (اسپانیا) تهیه شد و تا زمان آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. ایزوله پروتئین آب پنیر در آبان ۱۳۹۲ از کارخانه پگاه مشهد تهیه گردید. تری‌کلرواستیک اسید، تریس<sup>۴</sup>، اسید هیدروکلریدریک از شرکت مرک، اسید

<sup>۱</sup> *Bacillus licheniformis*

<sup>۲</sup> Food Grade

<sup>۳</sup> Endoproteinase

<sup>۴</sup> Tris

خام اولیه، از روش کلدال با ضریب نیتروژن ۶/۲۵ استفاده شد (ساخت آلمان، شرکت بهر، مدل S3) و میزان خاکستر نیز با قرار دادن نمونه خام در کوره الکتریکی (ساخت آلمان، شرکت نابترم<sup>۳</sup>، مدل FX118-30) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد تعیین گردید (AOAC, 2000).

#### اندازه گیری بازیافت نیتروژنی

بازیافت نیتروژن یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیمها در هیدرولیز پروتئینهای غذایی محسوب می شود که بیان کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئینهای محلول از انواع غیرمحلول و در نتیجه میزان بازدهی فرایند در طی هیدرولیز آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می باشد (Liaset et al., 2002). به منظور اندازه گیری راندمان بازیافت نیتروژنی از روش Liaset و همکاران استفاده شد (Liaset et al., 2002) و بازیافت نیتروژن مطابق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$= \frac{\text{مقدار پروتئین هیدرولیز شده (گرم)} \times \text{میزان نیتروژن در پروتئین هیدرولیز شده}}{\text{مقدار نمونه خام} \times \text{در نیتروژن نمونه خام}} \times 100$$

#### بهینه سازی شرایط آزمایش

تیمارهای آزمایشی به منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش بینی نشده در پاسخهای مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. مدل رگرسیونی چندجمله ای درجه دوم به منظور پیش بینی پاسخ در نظر 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  $\gamma$  متغیر وابسته (درجه هیدرولیز) می باشد،  $\beta_0$  ثابت بوده و  $\beta_i$  و  $\beta_{ii}$  و  $\beta_{ij}$  ثابتهای برآورد شده توسط مدل هستند.  $X_i$  و  $X_j$  سطح متغیرهای مستقل هستند و آنها به ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه دوم و متقاطع<sup>۴</sup> متغیرهای  $X_1$ ،  $X_2$  و  $X_3$  روی پاسخ می باشند. مدل، اثر هر متغیر را روی پاسخ ارزیابی می نماید (Bezerra et al., 2008).

سولفوریک و سود پرک از شرکت های معتبر داخلی تهیه گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

#### تهیه پروتئین هیدرولیز شده ایزوله پروتئین آب پنیر

ابتدا نمونه ایزوله پروتئین 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 میلی لیتری در انکوباتور شیکردار (ساخت کره جنوبی، شرکت ویژن<sup>۱</sup> 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 به منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن آنزیم واکنش آنزیمی با حرارت دادن سوسپانسیون در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه به اتمام رسیده و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ به سرعت سرد گردید و در انتها در سانتریفیوژ یخچال دار (ساخت کره جنوبی، شرکت هانیل<sup>۲</sup>، مدل Combi - 514R) با دور  $6700 \times g$  در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه جهت جمع آوری سوپرناتانت قرار گرفت (Ovissipour et al., 2009b). به منظور یافتن دامنه مناسب شرایط هیدرولیز جهت بهینه سازی، ابتدا پیش تیمارهایی در شرایط مطابق با دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی گراد و زمانهای ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه و فعالیتهای آنزیمی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین صورت پذیرفت (دادههای حاصل ذکر نشده است).

#### 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 سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا این که وزن ظرف ثابت گردید (AOAC, 2005). برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد

<sup>1</sup> Vision

<sup>2</sup> Hanil

<sup>3</sup> Nabertherm

<sup>4</sup> Cross

## - تجزیه و تحلیل آماری

بهینه‌سازی داده‌ها به روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD<sup>1</sup>) با استفاده از نرم افزار Design Expert<sup>2</sup> انجام گرفت و رسم نمودارهای سه‌بعدی و به‌دست آوردن معادلات ریاضی توسط نرم افزار Design Expert صورت پذیرفت.

## یافته‌ها

## - ترکیبات شیمیایی مواد خام اولیه

در ابتدای آزمایش درصد رطوبت، خاکستر و پروتئین اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

## - آنالیز سطح پاسخ

به‌منظور بهینه‌سازی بازیافت نیتروژن پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی با ۵ سطح و ۶ تکرار در نقطه مرکزی مورد استفاده قرار گرفت (+α، +۱، ۰، -۱ و -α).

طرح آزمایشی با سطوح کدبندی شده متغیرهای مستقل و نتایج بازیافت نیتروژنی مربوط به هر تیمار در جدول ۳ آورده است.

۳۸

تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و رگرسیون داده‌های آزمایش یمربوط به بازیافت نیتروژنی به‌منظور انطباق مدل ریاضی و تعیین ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب به ترتیب در جدول ۴ آورده شده‌اند. ضرایب رگرسیون چندگانه<sup>۳</sup> از طریق روش حداقل مربعات<sup>۴</sup> به‌منظور پیش‌بینی مدل چند جمله‌ای درجه دوم<sup>۵</sup> برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب، مدل پیشنهادی زیر برای بازیافت نیتروژنی ارائه گردید:

$$Y = -751.88 + 0.3031x_1 + 29.86x_2 + 0.926x_3 - 0.001394x_1^2 - 0.3141x_2^2 - 0.004937x_3^2 + 0.00166x_1x_2 + 0.00289x_1x_3 + 0.0000209x_2x_3$$

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ با ضرایب مشخص می‌باشد.  $R^2 = 0.9247$  موید این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۲/۴۷ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد.  $R^2$  واقعی و  $R^2$  تعدیل شده<sup>۶</sup> که به ترتیب ۰/۹۲۴۷ و ۰/۸۵۶۴ به‌دست آمدند بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بوده‌اند.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی ایزوله پروتئین آب پنیر (انحراف معیار ± میانگین)

پروتئین (درصد)	رطوبت (درصد)	خاکستر (درصد)
۸۲ ± ۰/۳۹	۱۳ ± ۰/۳۳	۲/۶ ± ۰/۱۸

\* پروتئین، رطوبت و خاکستر، براساس وزن مرطوب گزارش گردید  
\*\* تمامی آزمایشات در ۳ تکرار صورت پذیرفته‌اند.

جدول ۲- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده جهت بهینه‌سازی بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر

متغیرهای مستقل	سطوح و حدود متغیرها				
	-α	-۱	۰	+۱	+α*
زمان (دقیقه)	۲۷/۵	۶۵	۱۲۰	۱۷۵	۲۱۲/۵
دما (درجه سانتی‌گراد)	۳۹/۹۳	۴۳	۴۷/۵	۵۲	۵۵/۰۷
فعالیت آنزیمی (واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین)	۲۹/۶۶	۴۵	۶۷/۵	۹۰	۱۰۵/۳۴

\* مقدار α برابر ۱/۶۸۱۸ می‌باشد.

<sup>1</sup> Central Composite Design <sup>2</sup> Design Expert, 8.0.7.1 Trial, Stat-Ease Inc. <sup>3</sup> Multiple Regression Coefficients  
<sup>4</sup> Least-Squares Yechnique <sup>5</sup> Quadratic Polynomial Model <sup>6</sup> Adjusted R-Squared

جدول ۳- طرح آزمایشی مرکب مرکزی و سطوح کدبندی شده و پاسخ متغیرهای مستقل برای بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر

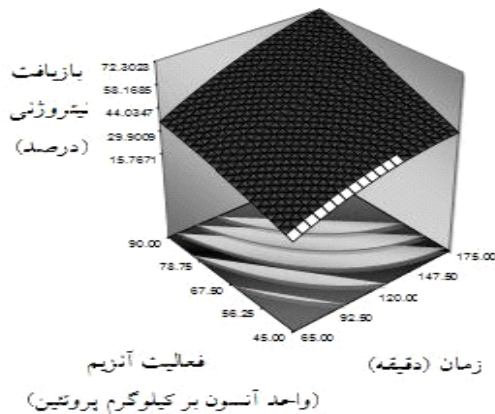
شماره تیمار	دما (x <sub>1</sub> )	زمان (x <sub>2</sub> )	فعالیت آنزیم (x <sub>3</sub> )	بازیافت نیتروژنی (درصد)
۱	۰	۰	۰	۴۸/۳۲
۲	۰	۰	۰	۴۵/۷۷
۳	-۱/۶۸۱۸	۰	۰	۳۰
۴	-۱	-۱	-۱	۱۰/۴۶
۵	۰	۰	۰	۳۶
۶	+۱	+۱	-۱	۲۹/۶۳
۷	۰	۰	+۱/۶۸۱۸	۷۰/۳۳
۸	-۱	+۱	+۱	۶۰/۳۱
۹	۰	۰	۰	۴۶/۹۲
۱۰	۰	۰	-۱/۶۸۱۸	۱۷/۶۹
۱۱	+۱	-۱	-۱	۱۰/۱
۱۲	۰	+۱/۶۸۱۸	۰	۶۳/۰۷
۱۳	۰	-۱/۶۸۱۸	۰	۱۵/۲۳
۱۴	-۱	+۱	-۱	۲۷/۵۲
۱۵	+۱	+۱	+۱	۶۱/۶۸
۱۶	۰	۰	۰	۴۶/۲۴
۱۷	-۱	-۱	+۱	۲۸/۱۱
۱۸	+۱/۶۸۱۸	۰	۰	۳۶/۱۷
۱۹	+۱	-۱	+۱	۲۸/۶۶
۲۰	۰	۰	۰	۶۱/۱۵

جدول ۴- جدول تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ برای بازیافت نیتروژنی

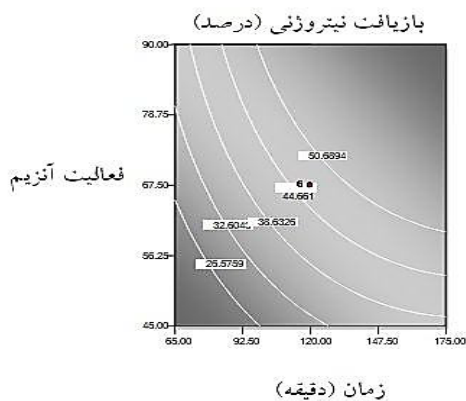
منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F	P
مدل	۹	۵۹۸۷/۹۶	۶۶۵/۳۳	۱۳/۵۹	۰/۰۰۰۲**
زمان	۱	۲۴۳۲/۵۷	۲۴۳۲/۵۷	۴۹/۶۷	<۰/۰۰۰۱**
دما	۱	۱۴/۴۵	۱۴/۴۵	۰/۳	ns. ۰/۵۹۸۹
فعالیت آنزیم	۱	۲۶۳۱/۶۸	۲۶۳۱/۶۸	۵۳/۷۴	<۰/۰۰۰۱**
زمان × زمان	۱	۲۵۶/۳۷	۲۵۶/۳۷	۵/۲۴	۰/۰۴۵۲*
دما × دما	۱	۵۸۳/۳	۵۸۳/۳	۱۱/۹۱	۰/۰۰۶۲**
فعالیت آنزیم × فعالیت آنزیم	۱	۹۰/۰۳	۹۰/۰۳	۱/۸۴	ns. ۰/۲۰۵
دما × زمان	۱	۱/۳۵	۱/۳۵	۰/۰۲۸	ns. ۰/۸۷۱۳
فعالیت آنزیم × دما	۱	۱۰۲/۴۶	۱۰۲/۴۶	۲/۰۹	ns. ۰/۱۷۸۷
زمان × فعالیت آنزیم	۱	۰/۰۰۳۶۱	۰/۰۰۳۶۱	۰/۰۰۰۰۷۳	ns. ۰/۹۹۳۳
باقیمانده	۱۰	۴۸/۷۱	۴۸/۹۷		
فقدان برازش	۵	۱۶۵/۶۱	۳۳/۱۲	۰/۵۱	ns. ۰/۷۶۰۶
خطای خالص	۵	۳۲۴/۱	۶۴/۸۲		
کل	۱۹	۶۴۷۷/۶۶			

\* و \*\* به ترتیب: معناداری در سطح ۵ و ۱ درصد - ns: غیرمعناداری

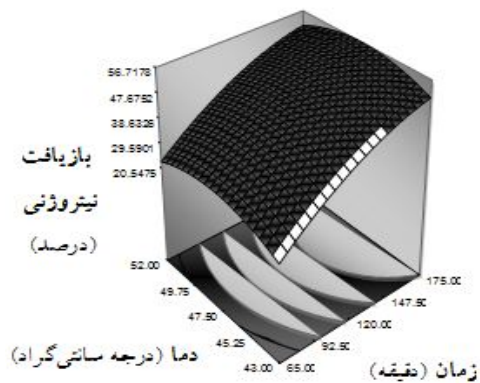
شکسته شدن زنجیره پپتیدی افزایش می‌یابد با پیشرفت واکنش نرخ رشد بازیافت کاهش می‌یابد.



شکل ۱- نمودار سه‌بعدی تغییرات بازیافت نیتروژن (درصد) در زمان‌ها (دقیقه) و فعالیت‌های آنزیمی (واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) مورد آزمایش



شکل ۲- نمودار کانتور تغییرات بازیافت نیتروژن در زمان‌ها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش



شکل ۳- نمودار سه‌بعدی تغییرات بازیافت نیتروژن (درصد) در دماها (درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های (دقیقه) مورد آزمایش

مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت، از آنجا که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود، مدل بر اساس بازیافت نیتروژنی برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده توانسته است تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد (Taheri *et al.*, 2011a).

جهت تعیین شرایط بهینه هر متغیر در حصول بالاترین بازیافت نیتروژنی، نمودارهای سه‌بعدی سطحی و کانتور<sup>۱</sup> برای متغیرها در شکل‌های ۱ تا ۶ ترسیم شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را روی پاسخ نمایش می‌دهند، درحالی‌که متغیر سوم در میزان بهینه‌اش ثابت نگه‌داشته شده است.

همان‌طور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشخص است با افزایش زمان هیدرولیز بازیافت نیتروژنی در یک فعالیت آنزیمی ثابت، افزایش می‌یابد. با افزایش فعالیت آنزیم از ۴۵ تا ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین میزان بازیافت نیتروژنی با فاز سریع افزایش می‌یابد. بیشترین بازیافت نیتروژنی در فعالیت آنزیمی ۸۷/۹۸ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین حاصل شده است.

در شکل‌های ۳ و ۴ که روند تغییرات بازیافت نیتروژنی در دماها و زمان‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهند، مشخص است با افزایش زمان در یک دمای ثابت و به‌ویژه در دماهای میانی بر میزان بازیافت نیتروژنی افزوده می‌گردد، اما از نرخ و شدت آن در زمان‌های ۱۴۷ تا ۱۷۵ دقیقه شدیداً کاسته شده است که بیانگر محدوده‌ی زمانی مناسب جهت بازیافت نیتروژنی می‌باشد به‌گونه‌ای که بیشترین میزان بازیافت در این محدوده زمانی واقع شده است. بیشترین میزان بازیافت در هیدرولیزهای طولانی مشاهده شد.

در شکل‌های ۵ و ۶ اثرات ترکیبی دما و فعالیت آنزیم بر میزان تغییرات بازیافت نیتروژنی نمایش داده شده است. ملاحظه می‌گردد که با افزایش فعالیت آنزیم در دماهای ثابت بر میزان بازیافت نیتروژنی افزوده می‌گردد و این روند افزایش در دماهای میانی شدیدتر بوده که بیانگر مناسب بودن این محدوده‌ی دما جهت هیدرولیز می‌باشد. با افزایش دما از ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرعت هیدرولیز به علت

۴۰

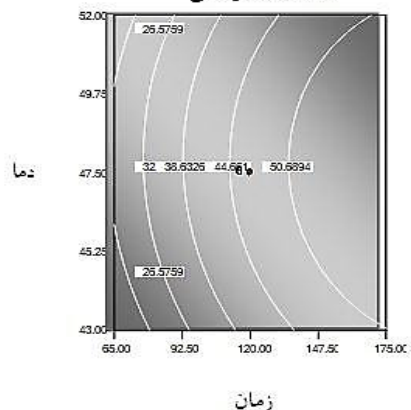
<sup>1</sup> Contour Plot

### بحث

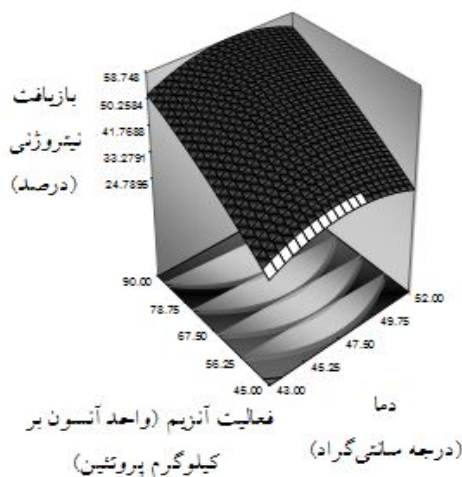
- **تغییرات میزان بازیافت نیتروژنی با افزایش زمان**  
 مشخص است با افزایش زمان در یک دمای ثابت و به‌ویژه در دماهای میانی بر میزان بازیافت نیتروژنی افزوده می‌گردد. بازیافت نیتروژن ۷۰ درصدی (Orban & Quaglia, 1990)، بازیافت نیتروژن ۴۷ درصدی (Kristinsson & Rasco, 2000)، بازیافت نیتروژن ۷۱ درصدی (Bhaskar et al., 2007)، بازیافت نیتروژن ۶۱/۹۶ درصدی (Ovissipour et al., 2009a) بازیافت نیتروژن ۷۵ درصدی (Modanlow et al., 2011) همراه با افزایش زمان هیدرولیز گزارش شده است. راندمان بازیافت نیتروژن در این مطالعه نیز حدود ۷۰/۶۶ درصد و در زمان ۱۷۳/۲ دقیقه برآورد شد.

- **تغییرات میزان بازیافت نیتروژنی با افزایش دما**  
 با افزایش فعالیت آنزیم در دماهای ثابت بر میزان بازیافت نیتروژنی افزوده می‌گردد و این روند افزایش در دماهای میانی شدیدتر بوده است. بیشترین بازیافت نیتروژنی در دمای  $37/1^{\circ}\text{C}$  به‌دست آمد. نتایج مشابهی در تحقیقی روی ماهی قره برون با استفاده از آنزیم آلکالاز به‌دست آمد (Ovissipour et al., 2009a)، آن‌ها نیز افزایش میزان بازیافت نیتروژنی را همراه با افزایش دما تا  $55^{\circ}\text{C}$  مشاهده کردند که بیانگر محدوده دمایی مناسب جهت بازیافت نیتروژنی می‌باشد به‌گونه‌ای که بیشترین میزان بازیافت در این محدوده دمایی واقع شده است، همچنین در تحقیقی بر روی امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با افزایش دما از  $30^{\circ}\text{C}$  تا  $37^{\circ}\text{C}$  سرعت هیدرولیز افزایش و در  $42^{\circ}\text{C}$  نرخ رشد بازیافت کاهش می‌یابد و بیشترین راندمان بازیافت نیتروژنی در دمای  $44^{\circ}\text{C}$ - $37/5^{\circ}\text{C}$  مشاهده شده است (Modanlow et al., 2011). از علت‌های کاهش سرعت هیدرولیز در دماهای بالاتر، می‌توان به کاهش باند‌های پپتیدی دست نخورده و کاهش فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر اشاره کرد (Kristinsson & Rasco, 2000). همان‌طور که در مدل پیشنهادی برای بازیافت نیتروژنی دیده می‌شود دما بالاترین ضریب را در بین ۳ فاکتور مستقل داشته، یعنی دما بیشترین تاثیر را بر بازیافت نیتروژنی گذاشته است و این با پژوهشی که مشگین‌فر و

بازیافت نیتروژنی

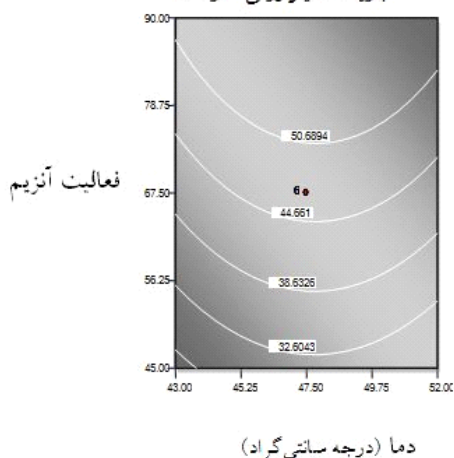


شکل ۴- نمودار کانتور تغییرات بازیافت نیتروژن در دماها و زمان‌های مورد آزمایش



شکل ۵- نمودار سه‌بعدی تغییرات بازیافت نیتروژن (درصد) در دماها (درجه سانتی‌گراد) و فعالیت‌های آنزیمی (واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) مورد آزمایش

بازیافت نیتروژنی (درصد)



شکل ۶- نمودار کانتور تغییرات بازیافت نیتروژن در دماها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش

همکاران بر روی فراورده‌های جانبی صنایع گوشت انجام دادند مطابقت داشت (مشگین فر و همکاران، ۱۳۹۱).

### - تغییرات بازیافت نیتروژنی همراه با افزایش نسبت آنزیم به سوسترا

شکل‌های اثر متقابل زمان و فعالیت آنزیم را بر روی میزان بازیافت نیتروژنی نشان می‌دهد. در فعالیت‌های آنزیمی بالاتر از ۷۸، به‌ویژه در زمان‌های بالا بازیافت نیتروژنی با فعالیت‌های آنزیمی پایین‌تر قابل مقایسه بوده و فعالیت آنزیمی مطلوب می‌تواند در این محدوده قرار بگیرد. بالاترین بازیافت نیتروژنی به دست آمده در این مطالعه در حدود ۷۰/۶۶ درصد که در دامنه فعالیت آنزیمی ۸۷/۹۸ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین حاصل شده است (شکل ۳- الف و ۳- ب). افزایش غلظت پروتئازها و بنابراین افزایش حجم هیدرولیز بازیافت نیتروژن محلول را زیاد می‌کند (Beddows & Ardeshir, 1979; Fik & Surowka, 1992; Rebeca et al., 1991). کاهش شدت بازیافت می‌تواند به علت کم شدن پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم و کم شدن فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم باشد. از سوی دیگر تشکیل ترکیبات ممانعت‌کننده<sup>۱</sup> از فعالیت آنزیمی نیز می‌تواند در این مورد اثرگذار باشند (Guerard et al., 2001; Ovissipour et al., 2009b). عدم مصرف بیش از حد لازم آنزیم از دیدگاه اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. Guerard و همکاران با استفاده از نسبت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵ درصدی آنزیم Umamizyme بیشترین بازیافت نیتروژنی را در نسبت آنزیمی ۱/۵ درصد گزارش کردند (Guerard et al., 2001). Aspmo و همکاران افزایش میزان بازیافت پروتئینی را همراه با افزایش نسبت آنزیمی مشاهده کردند (Aspmo et al., 2005). Modanlow و همکاران نیز بیشترین بازیافت نیتروژنی را در دامنه فعالیت آنزیمی ۲/۴۱-۳/۲۶ میلی‌گرم مشاهده کردند (Modanlow et al., 2011). در این مطالعه شرایط بهینه هیدرولیز جهت حصول بالاترین بازیافت نیتروژنی، مطابق با شرایط زمان ۱۷۳/۲ دقیقه، دمای ۴۷/۱ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۸۷/۹۸ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین به دست آمد که بازیافت نیتروژنی ۷۰/۶۶ درصد حاصل شد.

- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی مدل بازیافت نیتروژنی  
شرایط بهینه هیدرولیز جهت حصول بالاترین بازیافت نیتروژنی مطابق با شرایط زمان ۱۷۳/۲ دقیقه، دمای ۴۷/۱ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۸۷/۹۸ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین به دست آمد که منطبق با بازیافت نیتروژنی ۷۰/۶۶ درصد بود. به‌منظور تایید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، در شرایط پیش‌بینی‌شده توسط مدل، هیدرولیز انجام گرفت (در سه تکرار) که بازیافت نیتروژنی در این شرایط ۶۹/۸۹ درصد به دست آمد. انطباق نسبی مقادیر آزمایشی با مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل، موید شرایط به دست آمده بهینه هیدرولیز در بازیافت نیتروژنی حداکثری از ایزوله پروتئین آب پنیر می‌باشد. راندمان بازیافت نیتروژنی در این پژوهش حدود ۷۰/۶۶ درصد به دست آمد که در مقایسه با سایر پژوهش‌های مشابه مقدار بالایی است.

### نتیجه‌گیری

تولید پروتئین هیدرولیز شده چندین هدف را دنبال می‌کند که از عمده‌ترین آنها، استفاده بهینه از بخش پروتئینی مواد غذایی، افزایش جذب و هضم این ترکیبات از طریق کاهش اندازه آن‌ها و افزایش ارزش غذایی و خواص زیستی آن‌ها می‌باشد. پیشرفت در تکنولوژی تولید پروتئین هیدرولیز شده امکان استفاده مناسب از منابع پروتئینی مختلف و غیر قابل دسترس را فراهم کرده است. با توجه به این‌که بازیافت نیتروژن یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود و در نتیجه میزان بازدهی فرایند در طی هیدرولیز آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می‌باشد. بهینه‌سازی بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیز شده، می‌تواند باعث صرفه جویی در زمان، هزینه و میزان آنزیم مورد استفاده گردد. شرایط بهینه هیدرولیز جهت حصول بالاترین بازیافت نیتروژنی، مطابق با شرایط زمان ۱۷۳/۲ دقیقه، دمای ۴۷/۱ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۸۷/۹۸ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین به دست آمد که بازیافت نیتروژنی ۷۰/۶۶ درصد حاصل شد.

<sup>1</sup> Inhibitor



## منابع

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to application. *Funct Food*, 1, 177-187.

Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81.

Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E. & Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmosalar*) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry*, 37, 1263-1269.

Modanlow, M., Rafiee, G. R., Motamedzadegan, A., Moeeni, S., Mirvaghefi, A. & Ovissipour, M. R. (2011). Effect of Different Ratio of Trypsin Enzyme, Times and Temperatures on Protein Recovery of Viscera Yellow Fin Tuna (*Thunus albacores*). *Iranian Food science and Technology*, 7(2), 137-144.

Ovissipour, M. R., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. & Shahiri, H. (2009a). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *J. Food Chemistry*, 115, 238-242.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. & 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.

Periago, M. J., Vidal, M. L., Ros, G., Rincón, F., Martínez, C., López, G., Rodrigo, J. & Martínez, I. (1998). Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour. *Food Chem.*, 63, 71-78.

Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE inhibitory peptides. *Trends Food Sci Tech.*, 11, 347-356.

Quaglia, G. B. & Orban, E. (1990). Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardinapilchardus*) protein hydrolysates. *Food Sci.*, 55(6), 1571-1573.

Rebeca, B. D., Pena-Vera, M. T. & Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; Yield and nutritional value. *Food Sci.*, 56, 309-314.

مشگین فر، ن. (۱۳۹۱). تهیه پروتئین هیدرولیز شده از

فراورده‌های جانبی صنایع گوشت و بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی آن. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۷۱ ص.

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

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

Aspmo, S. I., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40, 957-1966.

Beddows, C. G. & Ardeshir, A. G. (1979). The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce Manufacture. *Food Technol.*, 14, 603-612.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.*, 76, 965-977.

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. & Lalitha, R. G. (2007). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, In Press.

Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G. & Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav.*, 54, 129-141.

Guerard, F., Duffose, L., De, La., Broise, D. & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1051-1059.

Ha, E. & Zeniel, M. B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *Nutr. Biochem.*, 14, 251-258.

Kim, S. B., Seo, I. S., Khan, M. A., Ki, K. S., Nam, M. S. & Kim, H. S. (2007). Separation of binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *Int Dairy*, 17, 625-631.

Sinha, R., Radha, C., Prakash, J. & Kaulm, P. (2007). Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.*, 101, 1484–1491.

Surowka, K. & Fik, M. (1992). Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 27, 9-20.

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.

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

Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M. & Millgn, F. (2001). Obtencion y aplicaciones de hidrolizad os proteicos. *Grasas Aceites*, 52, 132-136.

Walzem, R. L., DiUard, C. J. & German, J. B. (2002). Wliey components: millennia of evolution creatfunctionalities formammaliannutrition: what we know and what we may be over lookins. *Crif Rev Food Sei Nwir.*, 42, 353-375.