بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دانشکده علوم دامی و شیلات

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی شیلات گرایش فرآوری محصولات شیلاتی

موضوع:

خواص کارکردی پودر پروتئینی تهیه شده از ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) به روش هیدرولیز بیوشیمیایی

دانشجو:

کیوان علی عسگری رنانی

اساتید راهنما:

دکتر سکینه یگانه

دکتر سید علی جعفرپور

استاد مشاور:

مهندس رضا صفری

بهمن ۱۳۹۳

فرم صورتجلسه دفاع بدون مهر و امضای دانشکده

کلیه حقوق مادی مرتبط بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری است

تقدیم به...

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم به آنان که مهر آسمانی‌شان آرام بخش آلام زمینی‌ام است...

به استوارترین تکیه‌گاهم، **دستان پرمهر پدرم**؛

به سبزترین نگاه زندگیم، **چشمان سبز مادرم**؛

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره‌ای از دریای بی‌کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم؛

امروز هستی‌ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما...

ره آوردی گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم، باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه غبار خستگی‌تان را بزداید.

بوسه بر دستان پرمهرتان

سپاسگزاری

کاش می شد اما...

عمر ما آنقدر طولانی نیست که مسیر زندگی را یک بار برای کسب تجربه بپیمایم و بار دیگر برای به کار بردن تجربه ها در زندگی به کار بریم.

یا باید دل به دریا زده و با هراس قدم در جاده ی زندگی بگذاریم، مسیری که در طول آن نه راهنمایی حضور دارد نه چراغی، و یا ابتدا خود را به چراغ روشن آگاهی مجهز نماییم و سپس با ایمان و اطمینان پا در راه بگذاریم.

از استاد گرانقدر و دلسوزم سرکار خانم **دکتر سکینه یگانه** که به دلیل یاری ها و راهنمایی های خود، بسیاری از سختی ها را برایم آسانتر نمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛

از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای **دکتر سید علی جعفرپور** که در کمال فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و بدون راهنمایی ایشان تامین این پایان‌نامه بسیار مشکل مینمود؛

از استاد صبور و مهربان، جناب آقای **مهندس رضا صفری**، که زحمت مشاوره این رساله را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید؛

از اساتید بافرزانه، جناب آقایان **دکتر فرمانی** و **دکتر اورجی** که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛

از نماینده تحصیلات تکمیلی، جناب **آقای دکتر دیرنده** که زحمت مدیریت جلسه ی دفاع را بر عهده داشتند و همچنین از **تمامی اساتید و مربیان گروه شیلات، علوم دام و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری**، به پاس سال ها همراهی و نیز **تمام دوستان و همکلاسی ها و هم اتاقی های عزیزم** که با طراوت وجود خود سختی ها را بر من آسان نمودند

کمال تشکر و قدر دانی را دارم...

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

کیوان علی عسگری

چکیده:

این پژوهش با هدف بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین آبکافت شده از سر و بازوی ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) و بررسی خواص کارکردی پودر پروتئین حاصله از قبیل حلالیت، ظرفیت جذب چربی، ظرفیت امولسیون کنندگی و ظرفیت کف کنندگی صورت پذیرفت. جهت بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین آبکافت شده از لحاظ دما، pH و نسبت آنزیم به سوبسترا از روش سطح پاسخ (RSM[1]) بر اساس طرح باکس-بنکن استفاده شد. در این مطالعه، اثر سه فاکتور نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و pH روی درجه‌ی آبکافت و بازیافت نیتروژنی به عنوان سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. مدل ریاضی، برازش خوبی با داده‌های آزمایش داشت، زیرا R^2 معادل ۰/۹۸ برای درجه آبکافت و معادل ۰/۹۶ برای بازیافت نیتروژنی نشان داد که قسمت عمده تغییرات درون محدوده آزمایش توسط مدل قابل توضیح است. براساس نتایج به دست آمده، شرایط بهینه از لحاظ دما، pH و نسبت آنزیم به سوبسترا به ترتیب عبارت بودند از دمای ۵۲/۹۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، pH : ۸/۴۹، و نسبت آنزیم به سوبسترای ۱/۹۹ درصد، که منجر به درجه آبکافت معادل ۱۴/۵۳ درصد و بازیافت نیتروژنی معادل ۳۶/۸۶ درصد گردید. عدم معنی‌داری در فاکتور فقدان برازش در این مطالعه نیز گواهی بر قابلیت مدل در پیش بینی دامنه‌های مورد استفاده در این آزمایش می‌باشد. جهت تایید شرایط پیشنهادی معادله ریاضی، پروتئین آبکافت شده با شرایط پیشنهاد شده‌ی مدل تولید گردید که درجه‌ی آبکافت آن ۱۶/۸ درصد و بازیافت نیتروژنی آن ۳۷/۵۹ درصد به دست آمد، که مطابق با هدف این تحقیق یعنی تولید پروتئین آبکافت شده با حداکثر درجه‌ی آبکافت و بازیافت نیتروژنی بود. سپس خواص کارکردی پروتئین حاصل از شرایط بهینه اندازه‌گیری شد که حلالیت، ظرفیت جذب چربی، ظرفیت امولسیون کنندگی و ظرفیت کف کنندگی این پودر پروتئینی به ترتیب برابر با ۶۴/۸ درصد در pH: ۹، ۰/۴ میلی لیتر روغن بر گرم پروتئین، ۵ درصد و ۱۵درصد بود، که نشان داد پودر پروتئین آبکافت شده حاصل از سر و بازوی ماهی مرکب ببری، از نظر خواص کارکردی ضعیف می‌باشد، ولی با این وجود بررسی ترکیب آمینو اسیدی پروتئین آبکافت شده سر و بازوی ماهی مرکب ببری نشان داد که این پروتئین دارای ارزش غذایی بالایی است. بطوری‌که نسبت میزان اسیدهای آمینه‌ی ضروری به کل اسیدهای آمینه در پروتئین آبکافتی برابر با ۵۵/۶ درصد بود و این نسبت برای میزان اسیدهای آمینه‌ی ضروری به غیرضروری برابر با ۱/۲۵ بود. شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت شده‌ی سر و بازوی ماهی مرکب نیز نشان داد که این پروتئین دارای مقادیر بالای اسیدهای آمینه ضروری است و نیاز یک انسان بالغ را به اسیدهای آمینه ضروری (پروتئین استاندارد FAO/WHO) برآورده می‌کند، اما در مقایسه با نیازهای ماهی کپور (پروتئین استاندارد NRC)، از نظر اسیدهای آمینه‌ی فنیل‌آلانین و ترئونین، محدود کننده می‌باشد. همچنین این پروتئین نرخ کارایی بالایی از خود نشان داد.

واژه‌های کلیدی:

بهینه‌سازی، آبکافت، آلکالاز، ماهی مرکب

1 - Response Surface Method

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲-کلیات ۵

۱-۲-۱- ساختار پروتئینی ۵

۱-۲-۱-۱- پروتئین میوفیبریل ۵

۱-۲-۱-۲- میوزین ۷

۱-۲-۱-۳- آکتین ۷

۱-۲-۱-۴- پارامیوزین ۷

۱-۲-۱-۵- تروپومیوزین و تروپونین ۷

۱-۲-۱-۶- پروتئین‌های سارکوپلاسمی ۸

۱-۲-۱-۷- پروتئین‌های استروما ۸

۱-۲-۲- روش‌های استخراج پروتئین ۸

۱-۲-۲-۱- تولید پروتئین آبکافتی به روش شیمیایی ۸

۱-۲-۲-۲- تولید پروتئین آبکافتی به روش بیوشیمیایی ۹

۱-۲-۳- درجه آبکافت ۱۰

۱-۲-۴- بازیافت نیتروژنی ۱۰

۱-۲-۵- کاربرد پروتئین آبکافت شده ۱۰

۱-۲-۶- اهمیت پروتئین‌ها ۱۱

۱-۲-۶-۱- ارزش تغذیه‌ای ۱۱

۱-۲-۷- خواص کارکردی ۱۲

۱-۲-۷-۱- حلالیت ۱۳

۱-۲-۷-۲- جذب روغن ۱۳
۱-۲-۷-۳- خواص امولسیون کنندگی ۱۳
۱-۲-۷-۴-کف زایی ۱۴
۱-۲-۸- آنالیز ترکیب اسیدهای آمینه ۱۵
۱-۳- حدود پژوهش ۱۷
۱-۴- فرضیات پژوهش ۱۷
۱-۵- اهداف پژوهش ۱۸

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- تاریخچه ۱۹
۲-۲- آنزیم ۱۹
۲-۳- آنزیم و خواص کارکردی ۲۱

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد مورد استفاده ۲۷
۳-۱-۱- مواد مصرفی ۲۷
۳-۱-۲- ماده خام اولیه ۲۷
۳-۲- ترکیب شیمیایی ۲۸
۳-۲-۱- رطوبت ۲۸
۳-۲-۲- چربی کل ۲۸
۳-۲-۳- پروتئین ۲۹
۳-۲-۴- خاکستر ۲۹
۳-۳- آنزیم ۳۰
۳-۴- آبکافت پروتئین سر و بازوی ماهی مرکب ۳۰
۳-۵- اندازه گیری پروتئین محلول ۳۳
۳-۶- اندازه گیری درجه آبکافت ۳۳
۳-۷- بازیافت نیتروژنی ۳۳

۳-۸- رنگ پودر پروتئینی ۳۳
۳-۹- اندازه گیری خواص کارکردی ۳۴
۳-۹-۱- حلالیت ۳۴
۳-۹-۲-ظرفیت جذب چربی ۳۴
۳-۹-۳- ظرفیت امولسیون کنندگی ۳۴
۳-۹-۴- ظرفیت کف کنندگی ۳۵
۳-۹-۵- اندازه گیری دانسیته توده‌ای ۳۵
۳-۱۰- تعیین ترکیب اسید آمینه ۳۵
۳-۱۱- اندازه گیری شاخص شیمیایی پروتئین ۳۶
۳-۱۲- نرخ کارایی پروتئین ۳۷
۳-۱۳- طرح آزمایشی و آنالیز آماری ۳۸

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- ترکیب شیمیایی سر و بازوی ماهی مرکب و پودر پروتئین آبکافت شده ۴۰
۴-۲- درجه آبکافت ۴۰
۴-۲-۱- آنالیز آماری مدل ۴۰
۴-۲-۲- تاثیر سطوح مختلف متغییرهای مستقل بر درجه آبکافت ۴۷
۴-۲-۳- بهینه‌سازی مدل ۵۱
۴-۳- بازیافت نیتروژنی ۵۲
۴-۳-۱- آنالیز آماری مدل ۵۲
۴-۳-۲- تاثیر سطوح مختلف متغییرهای مستقل بر بازیافت نیتروژنی ۵۸
۴-۳-۲- بهینه‌سازی مدل ۶۳
۴-۴- شرایط بهینه برای درجه آبکافت و بازیافت نیتروژنی ۶۵
۴-۵- رنگ پودر پروتئینی ۶۶
۴-۶- خواص کارکردی: حلالیت، ظرفیت جذب چربی، ظرفیت امولسیون کنندگی، ظرفیت کفزایی و دانسیته توده‌ای ۶۷
۴-۷- ترکیب اسید آمینه ۶۷

۴-۸- شاخص شیمیایی ۶۹
۴-۹- نرخ کارایی پروتئین ۷۰

فصل پنجم: بحث

۵-۱- ترکیب شیمیایی ۷۲
۵-۲-درجه آبکافت ۷۲
۵-۳- بازیافت نیتروژنی ۷۳
۵-۴- شرایط بهینه برای درجه آبکافت و بازیافت نیتروژنی ۷۴
۵-۵- رنگ پودر پروتئینی ۷۶
۵-۶-خواص کارکردی ۷۶
۵-۶-۱- حلالیت ۷۶
۵-۶-۲- ظرفیت جذب چربی ۷۷
۵-۶-۳- ظرفیت امولسیون کنندگی ۷۸
۵-۶-۴- ظرفیت کف کنندگی ۷۸
۵-۶-۵- دانسیته توده‌ای ۷۸
۵-۷- ترکیب اسید آمینه ۷۹
۵-۸-شاخص شیمیایی ۸۰
۵-۹- نرخ کارایی پروتئین ۸۰
۵-۱۰- نتیجه‌گیری نهایی ۸۲
۵-۱۱- پیشنهادات ۸۳
منابع ۸۴
چکیده انگلیسی ۹۰

فهرست اشکال

شکل عنوان **صفحه**

۱-۱- نمای شماتیک رشته‌های ضخیم و نازک میوفیبریل ۵

۱-۲- رشته‌ی ضخیم میوفیبریل و حالت قرار گیری پارامیوزین و میوزین ۶

۳-۱- آبکافت پروتئین سر و بازوی ماهی مرکب ۳۲

۳-۲- پودر پروتئین به دست آمده از آبکافت آنزیمی سر و بازوی ماهی مرکب ۳۲

۴-۱- رابطه بین درجه آبکافت تخمینی (درصد) و درجه آبکافت واقعی (درصد) برای آبکافت سر و بازوی ماهی مرکب ... ۴۳

۴-۲- مقدار احتمال نرمال (درصد) نسبت به باقی مانده استیودنت داخلی برای درجه آبکافت سر و بازوی ماهی مرکب .. ۴۳

۴-۳- اثر نسبت آنزیم به سوبسترا بر درجه آبکافت پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ۴۷

۴-۴- اثر دما بر درجه آبکافت پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ۴۸

۴-۵- اثر pH بر درجه آبکافت پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ۴۸

۴-۶- نمودار سه بعدی و کانتر تغییرات درجه آبکافت در نسبت‌های آنزیم به سوبسترا و دماهای مورد آزمایش ۴۹

۴-۷- نمودار سه بعدی و کانتر تغییرات درجه آبکافت در نسبت‌های آنزیم به سوبسترا و دماهای مورد آزمایش ۵۰

۴-۸- نمودار سه بعدی و کانتر تغییرات درجه آبکافت در نسبت‌های آنزیم به سوبسترا و دماهای مورد آزمایش ۵۰

۴-۹- تاثیر همزمان سه متغییر اصلی فرآیند بر درجه آبکافت پروتئین آبکافت شده سر و بازوی ماهی مرکب ۵۱

۴-۱۰- رابطه بین بازیافت نیتروژنی تخمینی (٪) و بازیافت نیتروژنی واقعی (٪) برای آبکافت سر و بازوی ماهی مرکب ... ۵۵

۴-۱۱- مقدار احتمال نرمال (٪) نسبت به باقی‌مانده استیودنت داخلی برای بازیافت نیتروژنی سر و بازوی ماهی مرکب... ۵۵

۴-۱۲- اثر نسبت آنزیم به سوبسترا بر بازیافت نیتروژنی پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ۵۹

۴-۱۳- اثر دما بر بازیافت نیتروژنی پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ۵۹

۴-۱۴- اثر pH بر بایافت نیتروژنی پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ۵۹

۴-۱۵- نمودار سه بعدی و کانتر تغییرات بازیافت نیتروژنی در نسبت‌های آنزیم به سوبسترا و pHهای مورد آزمایش ۶۱

۴-۱۶- نمودار سه بعدی و کانتر تغییرات بازیافت نیتروژنی در دماها و pHهای مورد آزمایش ۶۲

۴-۱۷- نمودار سه بعدی و کانتر اثر متغییرهای دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر بازیافت نیتروژنی ۶۲

۴-۱۸- تاثیر همزمان سه متغییر اصلی فرآیند بر بازیافت نیتروژنی پروتئین آبکافت شده سر و بازوی ماهی مرکب ۶۳

۴-۱۹- حلالیت پروتئین آبکافت شده در آب در pH های مختلف ۶۷

فهرست جداول

جدول عنوان **صفحه**

۱-۱- اندازه و ضخامت رشته‌های ضخیم میوفیبریل ۶

۱-۲- ترکیبات میوفیبریل پروتئین ۶

۳-۱- لیست مواد شیمیایی مورد استفاده ۲۷

۳-۲- متغییرهای مستقل و سطوح مورد استفاده در بهینه‌سازی آبکافت آنزیمی با استفاده از RSM..... ۳۱

۳-۳- شرایط آبکافت سر و بازوی ماهی مرکب ببری ۳۱

۳-۴- برنامه کاربرد فاز متحرک HPLC برای سنجش اسیدهای آمینه در طی زمان اندازه گیری ۳۷

۳-۵- معادلات مربوط به نرخ کارایی پروتئین آبکافت شده مورد استفاده در این تحقیق ۳۸

۴-۱- ترکیب شیمیایی ماده خام و پودر پروتئین آبکافت شده..... ۴۰

۴-۲- طرح آزمایشات درجه آبکافت سر و بازوی ماهی مرکب و مقدار درجه آبکافت واقعی و پیش‌بینی شده ۴۱

۴-۳- تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از سطح پاسخ جهت درجه آبکافت ۴۲

۴-۴- خلاصه مدل آماری برای درجه آبکافت ۴۴

۴-۵- نتایج تجزیه و تحلیل معادله رگرسیون برای درجه آبکافت پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ببری ۴۵

۴-۶- نتایج تخمین ضرایب برای معادله رگرسیون درجه آبکافت سر و بازوی ماهی مرکب ببری ۴۶

۴-۷- پارامترهای بهینه‌یابی برای متغییرهای مستقل و پاسخ برای درجه آبکافت..... ۵۲

۴-۸- شرایط بهینه‌ی آبکافت و حداکثر میزان درجه آبکافت..... ۵۲

۴-۹- طرح آزمایشات بازیافت نیتروژنی سر و بازوی ماهی مرکب و مقدار بازیافت نیتروژنی واقعی و پیش‌بینی شده ۵۳

۴-۱۰- تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از سطح پاسخ جهت بازیابی نیتروژنی..... ۵۳

۴-۱۱- خلاصه مدل آماری برای بازیافت نیتروژنی ۵۶

۴-۱۲- نتایج تجزیه و تحلیل معادله رگرسیون برای بازیافت نیتروژنی پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ببری ... ۵۷

۴-۱۳- نتایج تخمین ضرایب برای معادله رگرسیون بازیافت نیتروژنی سر و بازوی ماهی مرکب ببری..... ۵۸

۴-۱۴- پارامترهای بهینه‌یابی برای متغییرهای مستقل و پاسخ برای بازیافت نیتروژنی..... ۶۴

۴-۱۵- شرایط بهینه برای حداکثر بازیافت نیتروژنی ۶۴

۴-۱۶- پارامترهای بهینه‌یابی برای متغییرهای مستقل و پاسخ برای درجه آبکافت و بازیافت نیتروژنی..... ۶۵

۴-۱۷- شرایط بهینه برای حداکثر درجه‌ی آبکافت و بازیافت نیتروژنی..... ۶۶
۴-۱۸- شاخص‌های رنگ برای پودر پروتئینی سر و بازوی ماهی مرکب..... ۶۶
۴-۱۹- ترکیب اسیدهای آمینه کل پروتئین آبکافت شده سر و بازوی ماهی مرکب ببری ۶۸
۴-۲۰- شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت شده سر و بازوی ماهی مرکب ببری ۶۹
۴-۲۱- نرخ کارایی پروتئین آبکافت شده سر وبازوی ماهی مرکب ببری و کازئین شیر ۷۰

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

افزایش روز افزون آگاهی نسبت به ارزش تغذیه‌ای، سلامت و بهداشت مواد غذایی سبب گردیده تا تقاضا برای مواد خوراکی مغذی و سالم بیشتر گردد. در این رابطه آبزیان خوراکی به عنوان منابع غنی از پروتئین با قابلیت هضم آسان و ارزش بیولوژیکی بالا که قادرند ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای چرب مفید را در دسترس قرار دهند از جایگاه خاصی برخوردار گردیده‌اند (رضوی شیرازی،۱۳۸۰). واژه‌ی غذای دریایی عموماً به گروه‌های متنوعی از آبزیان مختلف شامل نه تنها ماهی، چه در زیستگاه آب شیرین، مصبی یا دریایی، بلکه همچنین ماهیان پوسته‌دار از قبیل سخت پوستان و نرم‌تنان بر می‌گردد (Venugopal, 2005). تولیدات شیلاتی یک بخش عمده تجارت بین المللی است که یک منبع با ارزش تجاری برای بسیاری از کشورهای در حال توسعه را شامل می‌شود (Venugopal, 2005).

فرآورده‌های جنبی ماهی به عنوان منابع کم ارزش شناخته می‌شوند. به اضافه، دفع نامناسب آن باعث آلودگی زیست محیطی می‌گردد. از طرفی بسیاری از این مواد، منابع غنی از ترکیبات با ارزش از جمله پروتئین‌ها محسوب می‌شوند (Ovissipour et al., 2009a, Ahmad et al., 2011). به طور سنتی، محصولات فرعی فرآوری ماهی، جهت تغذیه حیوانات به پودر تبدیل می‌گردد (Strøm and Eggum, 1981). با این وجود، بسیاری از این تولیدات دارای ارزش اقتصادی کمی هستند. روش‌های جدید فرآوری جهت تبدیل گونه‌های کم مصرف و محصولات فرعی به محصولات مفید و قابل عرضه در بازار نیاز است.

اکثر محصولات غنی از پروتئین، دارای محدوده‌ی وسیعی از خواص می‌باشند (Phillips et al., 1994b) و پتانسیل استفاده در غذا به عنوان بایندر، امولسی‌فایر و تشکیل ژل را دارند. کاربرد تکنولوژی آنزیمی، جهت بازیابی و اصلاح پروتئین ماهی می‌تواند طیف گسترده‌ای از عناصر غذایی و محصولات دیگر برای محدوده‌ی وسیعی از کاربردها را تولید کند. تیمارهای آنزیمی، پروتئین، پپتیدها و آمینو اسیدهایی تولید می‌کنند که می‌توانند ویژگی‌های بیولوژیکی و کاربردی پروتئین را بهبود بخشند و کیفیت آن را بهتر کنند، و فرصت‌های جالبی برای کاربری غذایی ارائه دهند (Balti et al., 2010).

سرپایان یکی از بزرگترین گروه‌های نرم‌تنان بوده که دارای حدود ۱۰۰۰ گونه شناخته شده در آب‌های جهان می‌باشند که از این میان بیش از ۱۰۰ گونه‌ی مهم تجاری تاکنون شناخته شده است (ولی نسب، ۱۳۷۲). رده‌بندی سرپایان دارای دو زیر رده ناتیلوئیده (Nautiloidea) با تعداد کمی گونه و نیام داران (Coleoidea) می‌باشد. زیر رده Coleoidea شامل دو زیر شاخه است، Belemnoidea، که در اواخر کرتاسه از بین رفته است و Neocoleoidea که شامل اختاپوس‌ها، اسکوئیدها و ماهیان مرکب می‌باشد. راسته‌ی Sepioidea شامل خانواده‌های Sepiidae، Seploiidae، Sepiadariidae، Idiosepiidae، Spirulidae می‌باشد (Silas et al., 1985). دو خانواده‌ی Idiosepiidae و Spirulidae گونه‌های اندکی را شامل شده و غالبا غیر خوراکی و فاقد هرگونه ارزش اقتصادی هستند. در میان سه خانواده دیگر، خانواده‌ی Sepiidae

از ارزش اقتصادی بالاتری برخوردار بوده و همواره در صیدهای سنتی و صنعتی بخش مهمی از صید را شامل می‌شوند (Yoshida et al., 2006). خانواده‌ی Sepiidae شامل بیش از ۱۰۰ گونه می‌باشد که در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و درجه حرارت‌های گرم در سراسر جهان پراکنده شده‌اند و در سه جنس Sepia، Metasepia و Sepiella قرار می‌گیرند (Ansell et al., 1998).

آب‌های جنوبی ایران نیز به دلیل خصوصیات جغرافیایی، زیستی و هیدروبیولوژیکی خاصی که دارند، یکی از مراکز عمده‌ی زیست این جانوران می‌باشد. در آب‌های جنوب کشور تاکنون ۸ گونه ماهی مرکب از دو جنس Sepia و Sepiella شناسایی شده که تماماً متعلق به خانواده‌ی Sepiidae می‌باشند. از جنس Sepia هفت گونه و از جنس Sepiella فقط یک گونه گزارش شده است(ولی نسب، ۱۳۷۲). ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) گونه غالب رده‌ی سرپایان در آب‌های جنوب کشور است. این گونه از ماهیان مرکب، در ایران در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان و در سراسر آب‌های جنوب کشور از استان سیستان و بلوچستان در شرق تا استان خوزستان در غرب پراکندگی دارند (ولی نسب، ۱۳۷۲). بر اساس آمار FAO میزان صید آن در ایران ۴۰۹۰ تن در سال می‌باشد (FAO, 2012).

با مطالعات انجام شده از سال ۱۳۷۰، ماهی مرکب ببری به عنوان یک گونه‌ی آبزی جدید قابل استحصال صادراتی، به جامعه‌ی شیلات معرفی گردید (ولی نسب، ۱۳۷۲). عضله‌ی این نرم‌تن، یک منبع پروتئینی است که می‌تواند در محصولات غذایی به عنوان ماده‌ی اولیه یا مکمل‌های پروتئینی برای تولید فراورده‌های غذایی گنجانده شود.

یکی از گزینه‌ها برای بالا بردن مصرف این نرم‌تن و استفاده از ارزش غذایی آن، تولید پودر پروتئین برای مصرف انسانی می‌باشد. تعدادی از روش‌های مورد استفاده برای استخراج پروتئین‌ها شامل استخراج با استفاده از pH اسیدی و بازی (Hultin and Kelleher, 2000)، روش‌های رسوب حرارتی (Sathivel et al., 2004) و هیدرولیز (آبکافت) شیمیایی یا بیوشیمیایی (Ovissipour et al., 2012b) است.

در روش آبکافت بیوشیمیایی پروتئین ماهی، آنزیم‌های بسیاری از قبیل پاپائین، آلکالاز، پروتامکس، نوتراز و ... مناسب توصیف شده‌اند (Aspmo et al., 2005). آنزیم‌هایی که با منشأ میکروبی جهت آبکافت استفاده می‌گردند در مقایسه با آنزیم‌های تهیه شده از حیوانات و گیاهان دارای چندین مزیت از قبیل تنوع فعالیت کاتالیکی، قابل دسترس بودن و مقاومت به رنج وسیعی از pH و دماهای مختلف هستند (Diniz and Martin, 1996).

آبکافت شیمیایی پروتئین که با شکستن باندهای پپتیدی توسط اسید و باز صورت می‌گیرد، روش دیگری برای تولید پروتئین آبکافت شده است. با این حال محدودیت‌های زیادی برای مواد غذایی دارد زیرا که نیازمند به فرایند پیچیده جهت کنترل است و تقریباً همواره منجر به محصولات با ترکیب شیمیایی و

خواص کارکردی مختلف می‌شود (Ovissipour et al., 2012b). پودر پروتئینی تولید شده با استفاده از این روش‌ها دارای خواص کارکردی (از قبیل ظرفیت نگهداری آب، خاصیت تشکیل ژل، کف کنندگی و امولسیون کنندگی) و فیزیکی متفاوتی هستند که بر پتانسیل استفاده به عنوان جزء غذایی تاثیر گذار هستند (Sathivel et al., 2005).

با توجه به اینکه قسمت گوشتی یا مانتل ماهی مرکب قابلیت صادرات دارد، سر و بازوها به عنوان ضایعات دور ریختنی مد نظر قرار می‌گیرند، می‌توان جهت جلوگیری از دور ریختن این ضایعات که خود آسیب‌های زیست محیطی را شامل می‌شوند و یا در عوض اینکه در جیره‌ی غذایی دام و طیور قرار گیرد، بصورت مستقیم وارد جیره‌ی غذایی انسان شوند، مطالعاتی در جهت تهیه پودر با کیفیت بالاتر انجام داد. لذا هدف از این تحقیق تهیه پودر پروتئینی از سر و بازو های ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) به روش آبکافت بیوشیمیایی با استفاده از آنزیم آلکالاز و بررسی خواص کارکردی آن می‌باشد.

۱-۲-کلیات

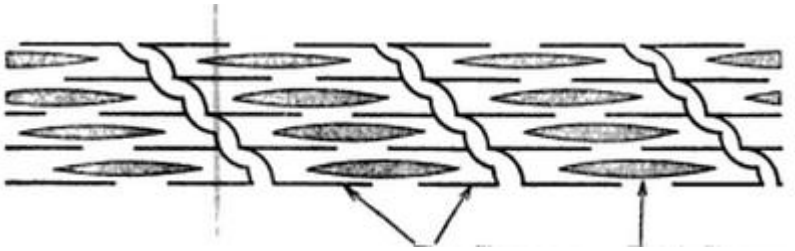
۱-۲-۱- ساختار پروتئینی

به دلیل شباهت ساختار پروتئینی سرپایان به همدیگر، ساختار پروتئینی اسکوئید در این قسمت شرح داده می‌شود که قابل تعمیم به سایر سرپایان از جمله ماهی مرکب می‌باشد.

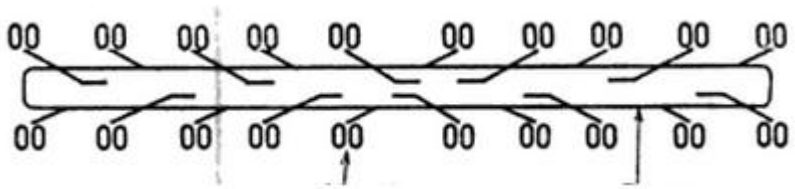
میزان پروتئین مانتل اسکوئید در حدود ۲۰٪ می‌باشد. این پروتئین به طور کلی به سه گروه تقسیم می‌گردد که عبارتند از پروتئین میوفیبریل، همانند سایر حیوانات، پروتئین‌های سارکوپلاسمی که فواصل پروتئین‌های میوفیبریل را پر می‌کند و پروتئین‌های استروما متشکل از بافت پیوندی. پروتئین‌های میوفیبریل بیشترین میزان پروتئینی را که در حدود ۸۰٪ است تشکیل می‌دهند. بعد از آن پروتئین‌های سارکوپلاسمی که در حدود ۱۲-۲۰٪ پروتئین‌های مانتل اسکوییید را تشکیل می‌دهد و در نهایت پروتئین‌های استروما که حدود ۲-۳٪ پروتئین مانتل را تشکیل می‌دهند (Sugiyama et al., 1989).

۱-۲-۱-۱- پروتئین میوفیبریل:

رشته‌های ضخیم و نازک در جهت محور طولی میوفیبریل عضله وجود دارد همانند شکل ۱-۱. رشته-های ضخیم شامل میوزین و رشته‌های نازک شامل F-actin و تروپومیوزین است که در آن G-actin بصورت کره‌های متعدد وجود دارد. بنابراین میوفیبریل اسکوئید همانند عضلات اسکلتی مهره‌داران عمل می‌کند. با این وجود فیلامنت‌های ضخیم اسکوئید دارای هسته‌های پارامیوزین می‌باشد که پروتئینی منحصر به فرد در بی‌مهرگان است، همانطور که در شکل ۱-۲ نشان داده شده. فیلامنت‌ها در این گروه از جانوران ضخیم‌تر و طویل‌تر از مهره‌داران می‌باشد (جدول ۱-۱)، زیراکه از حاشیه توسط میوزین جهت ایجاد یک ساختار خاص محصور شده‌اند.



شکل ۱-۱ نمای شماتیک رشته‌های ضخیم و نازک میوفیبریل (Sugiyama et al., 1989)



شکل ۱-۲ رشته‌های ضخیم میوفیبریل و حالت قرارگیری پارامیوزین و میوزین (Sugiyama et al., 1989)

جدول ۱-۱. اندازه و ضخامت رشته‌های ضخیم میوفیبریل (Sugiyama et al., 1989)

عضله	طول (µm)	قطر (nm)
عضله مورب بی‌مهرگان (اسکوئید، اویستر)	۷-۴	۵۰-۳۰
عضله مخطط بی‌مهرگان (کرب و خرچنگ)	۷/۵-۴	۲۰-۱۶
عضله مخطط مهره‌داران (خرگوش و قورباغه)	۱/۶	۱۳

جدول ۱-۲. ترکیبات میوفیریل پروتئین (Sugiyama et al., 1989)

عضله	میوزین	آکتین	پارامیوزین	تروپومیوزین	دیگر موارد
عضله‌ی مورب اسکوئید *Todarodes pacificus*	۵۴	۱۷	۱۴	۸	۷
عضله مورب *patinopecten yessoensis*	۶۶	۲۵	۳	۶	۰
عضله مورب اویستر	۳۹	۲۳	۱۹	–	۱۹
عضله صاف اویستر	۲۹	۹	۳۸	–	۲۴
عضله اسکلتی خرگوش	۶۰	۲۰	۰	۴/۵	۱۵/۵

جدول ۱-۲ ترکیبات پروتئین میوفیبریل مانتل اسکوئید و دیگر جانوران را نشان می‌دهد. همانطور که در جدول آمده، ترکیب پروتئینی و ساختار میوفیبریل اسکوئید با ترکیب پروتئینی و ساختار میوفیبریل عضلات اسکلتی مهره‌داران متفاوت است، اما مکانسیم انقباضی آن دارای تئوری لغزشی یکسان با مهره‌داران می‌باشد، از این جهت که میوفیبریل‌ها متشکل از دو نوع فیلامنت با ضخامت‌های متفاوت می‌باشند. با این وجود مکانیسم تنظیم انقباض آن با مهره‌داران متفاوت است.

۱-۲-۱-۲- میوزین:

میوزین سطح پارامیوزین را می‌پوشاند (شکل ۱-۲) که فیلامنت ضخیم را تشکیل می‌دهد. میوزین عمده‌ترین جزء در پروتئین‌های تشکیل‌دهنده‌ی مانتل را شامل می‌شود همانطور که در بسیاری از دیگر موجودات نیز صادق است (جدول ۱-۲). میوزین متشکل از دو زنجیره‌ی سبک و سنگین می‌باشد. وزن مولکولی زنجیره‌ی سنگین در اسکوئید همانند مهره‌داران می‌باشد، در مهره‌داران، سه نوع زنجیره سبک دیده می‌شود، در حالیکه در اسکوئید، تنها دو نوع قابل مشاهده است (Sugiyama et al., 1989).

میوزین نقش مهمی در انقباض و شکل‌گیری ساختار عضله را بازی می‌کند، و به علت وجود آنزیم‌های با فعالیت ATP-ase، دارای خواص ویژه است.

۱-۲-۱-۳- آکتین:

پروتئین اصلی تشکیل‌دهنده‌ی فیلامنت‌های نازک میوفیبریل است. مولکول‌های کروی که G-actin نامیده می‌شوند در فیبر به هم متصل شده و F-actin را تشکیل می‌دهند. دو رشته در هم تنیده شده و به همراه تروپومیوزین، فیلامنت نازک را تشکیل می‌دهند. G-actin که تشکیل‌دهنده‌ی F-actin می‌باشد محلول در نمک است (Sugiyama et al., 1989).

۱-۲-۱-۴- پارامیوزین:

این یک پروتئین اختصاصی در بی‌مهره‌گان است و تشکیل‌دهنده‌ی هسته‌ی فیلامنت ضخیم میوفیبریل می‌باشد. این پروتئین بیشترین میزان پروتئین را بعد از میوزین و آکتین در اسکوئید شامل می‌شود.

۱-۲-۱-۵- تروپومیوزین و تروپونین:

تروپومیوزین نوع αβ در مهره‌داران، از دو زیر واحد α و β تشکیل شده. در ماهی به غیر از ماکرل و تن، نوع αα از دو زیر واحد یکسان تشکیل شده است. تروپومیوزین در اسکوئید همانند خرگوش متشکل از