

Effect of a combined coating of alginate and watercress seed gum with hydrolyzed chia seed protein on the qualitative, chemical and sensory properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) nuggets

Naseri M.^{1,2*}; Hedayatifard M.¹; Javadian R.¹; Bahram S.¹; Ranjabar V.²; Habibi F.²; Davoudi A.²; Razaghian Gh.R.²; Rekabi M.²; Taghavi J.²

*Naseri.m1992@gmail.com

1-Department of Fisheries and Seafood, Faculty of Natural Resources, QaS.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

2-Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran

Received: November 2025

Accepted: January 2026

Published: July 2026



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), owing to its easy accessibility and lower cost compared to marine fish, presents economic opportunities for developing by-products (Ojagh *et al.*, 2018). The introduction of fish nuggets, with their desirable flavor and taste, can stimulate consumer demand for aquatic products. Ready-to-eat and semi-prepared foods hold a significant market share, valued for their crispy texture, attractive appearance, color, and enhanced flavor. Deep-frying is a common food processing technique where food is cooked in hot oil at temperatures exceeding the boiling point of water (Chen *et al.*, 2009). This method aims for rapid food processing to extend shelf life while simultaneously creating unique textural, color, aroma, and flavor attributes. Strategies to minimize oil absorption during deep-frying include coating with hydrocolloids (such as edible coatings and gums) and the utilization of bioactive peptides from plant sources. Chia seeds (*Salvia hispanica*) are recognized for their nutritional richness, including high protein content (15–23%), antioxidants, dietary fiber, vitamins, and minerals. Notably, their oil is abundant in alpha-linolenic acid (Omega-3). Their unique rheological properties and ease of extraction have led to their application as thickening and gelling agents in the food industry, with products formulated using chia seed gum achieving positive consumer acceptance. The text also references *Lepidium sativum* (garden cress) concerning its oil content and thickening capabilities; however, clarification on the specific scientific name employed in the study may be beneficial. Enzymatic protein hydrolysis, employing either endogenous enzymes (autolysis process) or commercial enzymes, is utilized

to improve protein characteristics and enhance bioactivity (Karazhiyan *et al.*, 2009). This study specifically utilized Alcalase (a protease from *Bacillus licheniformis* with an activity of 4.2 AU/mL) and Flavourzyme (an exopeptidase with an activity of 1.5 AU/mL) (Oveysipour *et al.*, 2012). The primary objective of this research was to assess the antioxidant properties of chia seed protein hydrolysates generated by these enzymes. Furthermore, the study aimed to investigate the impact of a composite coating, comprising alginate and garden cress gum, on the physicochemical and sensory properties of fish nuggets. This research endeavors to leverage these components to enhance the quality and appeal of fish nugget products.

Methodology

Preparation of chia seeds and (Alcalase enzyme - Flowerzyme) extracted from Novazyme, Denmark. The protein content of chia seeds was measured by the Kjeldahl method (Villanueva-Lazo *et al.*, 2022). Preparation of fat-free flour and protein isolate from chia seeds was carried out using the method of Zhou *et al.* (2006). To measure the hydrolysis of chia seed protein isolate in the present study, 6 treatments were selected. Treatment 1: Flowerzyme + 10 minutes of hydrolysis time. Treatment 2: Flowerzyme + 20 minutes of hydrolysis time. Treatment 3: Flowerzyme + 30 minutes of hydrolysis time. Treatment 4: Alcalase + 10 minutes of hydrolysis time. Treatment 5: Alcalase + 20 minutes of hydrolysis time. Treatment 6: Alcalase + 30 minutes of hydrolysis time. The degree of hydrolysis was calculated using the method of (Villanueva-Lazo *et al.*, 2022). The approximate length of the peptides resulting from hydrolysis was measured (Chatterjee *et al.*, 2015). The protein recovery rate was determined by the Biuret method and the antioxidant activity was determined by the DPPH method (He *et al.*, 2013). Extraction of (*Lepidium sativum*) seed gum was performed using the method of Karazhiyan *et al.* (2011). Preparation of wheat flour coating with different percentages by the method (Chen *et al.*, 2009). Fish nuggets (*Hypophthalmichthys molitrix*) were prepared and physical, chemical, textural and sensory tests were performed (Asadi Farsani, 2018). The moisture content and the amount of absorbed oil were measured using the method (Avak and Glaser, 2005). The texture measurement test was calculated using the Instron texture measurement device according to the method of (Das *et al.*, 2008). The coating percentage and frying efficiency of fish nuggets were calculated according to the formula (Darai Garmkhaneh *et al.*, 2009). Peroxide value was measured using the method of (Ronald and Ronald, 1991). (TBA) was measured using a colorimetric method (Hedayatifard and Miri, 2017). The (TVB-N) index was determined by the Kjeldahl method (Avak and Glaser, 2005). Sensory evaluation was investigated using the hedonic test method (Asadi Farsani, 2018).

Results

The initial protein measurements of chia seeds and its protein isolate were (23.91 ± 1.00) and (40.82 ± 1.24), respectively. The results showed that the degree of hydrolysis of the alkalase enzyme was higher than that of flowerzyme ($p < 0.05$). The measurement of protein recovery values showed that the alkalase enzyme was higher than that of flowerzyme ($p < 0.05$). The results of determining the peptide chain length by alkalase were lower than that of flowerzyme ($p < 0.05$). The results of determining the protein levels in

different treatments showed that the alkalase enzyme was higher than that of flowerzyme ($p<0.05$). The results of the DPPH free radical scavenging activity in different treatments showed that the highest activity was related to the alkalase enzyme (82.02%). The results showed that the lowest oil absorption rate was observed in the alginate + gum + 1% hydrolyzed protein (12.15%) treatment ($p<0.05$). The highest moisture absorption was observed in the treatments of alginate + gum + hydrolyzed protein 0.5 and 1% (56.84 and 57.45 percent, respectively) ($p<0.05$). The lowest tissue stiffness was observed in the treatment of alginate + gum + 1% hydrolyzed protein (41.7%) ($p<0.05$). The highest coverage was observed in the treatments of alginate + gum + hydrolyzed protein 0.5 and 1% (36.05 and 36.54%, respectively) ($p<0.05$). The highest frying efficiency values were observed in the treatments of alginate + gum + hydrolyzed protein with concentrations of 0.5 and 1% (78.93 and 79.24 percent, respectively) ($p<0.05$). The results of peroxide value under the influence of time and treatment showed that the highest values were observed in the control treatment and the lowest values were observed in the alginate + gum + 1% hydrolyzed protein treatment ($p<0.05$). The results of statistical analysis of thiobarbituric acid values during the storage period showed that the highest values were observed in the control treatment and the lowest values were observed in the alginate + gum + 1% hydrolyzed protein treatment ($p<0.05$). The lowest values of volatile nitrogen bases were observed in the alginate + gum + hydrolyzed protein treatment (0.5 and 1 percent) ($p<0.05$). The results of sensory evaluations showed that the sensory score of the alginate + gum + hydrolyzed protein treatment was 0.5 and 1 percent lower than the other treatments, respectively ($p<0.05$). In general, the results showed that the alginate and watercress seed gum coating has antioxidant properties and hydrolyzed chia seed protein increased its antioxidant properties, so that the alginate, watercress seed gum and hydrolyzed protein coating significantly delayed the oxidative spoilage process in the nugget and increased the shelf life of the nugget, and in all tests it had a better effect than the synthetic BHA preservative. Therefore, the combination of alginate (2%), watercress seed gum (1%) and hydrolyzed chia seed protein at the level (1% hydrolyzed) with the alkalase enzyme for (30 minutes) can play a significant role in improving the quality characteristics of fried nuggets and increasing their shelf life during storage, and also meet the consumer need for better and safer seafood products.

Conclusions

The protein recovery rate is affected by the increase in the degree of hydrolysis (Ovisipour *et al.*, 2013). The reduction in the peptide chain length of the alkalase enzyme is inversely proportional to the degree of hydrolysis (Namati *et al.*, 2012). DPPH is related to factors such as process time, degree of hydrolysis, and the performance of each enzyme in producing active peptides and releasing lipophilic antioxidant amino acids (He *et al.*, 2013). The reason for the reduction in oil absorption in the treatment is strongly influenced by the solubility and hydrophobicity of the protein surface (Mazloumi-Kiapi *et al.*, 2019). The decrease and increase in moisture in the treatments is due to the gel formation characteristic during heating and the high degree of coating and the creation of a relatively thick layer (Bahrami and Khadami, 2020). Hydrocolloids with their water retention capacity soften the texture of the nugget and reduce the stiffness of the texture (Altunakar *et al.*, 2006). The high coating rate in the two treatments of 0.5 and 1% is due to

the amount of adhesive that adheres to the fish nuggets (DaraiGarmkhanei *et al.*, 2014). The frying process causes cell collapse, less oil absorption and increases frying efficiency. (Mokhtariyan and Tavakolipour, 2014). The amount of thiobarbituric acid, due to the coating formed on the surface of the nugget, reduces the amount of product contact with oxygen, the rate of initial oxidation of fats and the subsequent formation of hydroperoxides (Mohan *et al.*, 2007). The amount of nitrogenous bases, by adding a coating, delays the presence of bacteria and the process of autolysis and protein decomposition (Darocha *et al.*, 2018). The overall acceptance index in the 0.5 and 1% treatments was approved by the evaluator (Bahrami and Khademi, 2020). In conclusion, the present study suggests several promising avenues for future research. These include exploring the functional and antioxidant properties of hydrolyzed chia seed proteins through enzymatic hydrolysis using proteases such as bromelain and ficin. Additionally, it is proposed to assess the potential of hydrolyzed chia seed proteins as a sustainable nitrogen source in bacterial culture media, with implications for both food science and biotechnology. Furthermore, investigating the synergistic effect of hydrolyzed chia seed proteins and vacuum packaging could offer a novel approach to enhancing the shelf life of marine products, thereby contributing to more effective food preservation techniques.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Acknowledgment

The authors would like to express their sincere gratitude to the esteemed Professor Dr. Hedayati Far for his valuable guidance throughout all stages of preparing this article, and to the Caspian Sea Ecology Research Institute for providing the necessary facilities and support for conducting this research

مقاله علمی - پژوهشی:

اثرات پوشش ترکیبی آلژینات و صمغ دانه شاهی (*Lepidium sativum*) همراه با پروتئین هیدرولیز شده دانه چیا (*Salvia hispanica*) بر ویژگی‌های کیفی، شیمیایی و حسی ناگت ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مسیب ناصری^{۱*}، مسعود هدایتی فرد^۱، روح‌اله جوادیان^۱، سمیه بهرام^۱، وحیدرنجبز^۲، فرشیده حبیبی^۲، ایوب داودی^۲، غلامرضا رازقیان^۲، مجتبی رکابی^۲، جواد تقوی^۲

*Naseri.m1992@gmail.com

۱- گروه شیلات و غذاهای دریایی، دانشکده منابع طبیعی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران
۲- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ چاپ: تیر ۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۴

چکیده

در مطالعه حاضر، اثرات پوشش ترکیبی آلژینات، صمغ دانه شاهی (*Lepidium sativum*) به همراه پپتیدهای زیست فعال حاصل هیدرولیز آنزیمی از دانه چیا (*Salvia hispanica*) بر ویژگی‌های کیفی و فساد اکسیداسیونی ناگت ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، خواص آن‌تی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده چیا با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز میکرو *Alcalase* و *Flavourzyme* تعیین شد. سپس تاثیر غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده (۵/۰ و ۱ درصد) به همراه پوشش ترکیبی آلژینات، صمغ دانه شاهی بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی ناگت ماهی در ابتدای دوره نگهداری و ویژگی‌های شیمیایی شامل پراکسید (PV)، مقادیر کلی بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) و تیوباریتوریک اسید (TBA) طی دوره نگهداری ۱۶ روزه در یخچال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که آنزیم *Alcalase* می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز (۲۲/۱۹ درصد)، محتوای پروتئینی (۹۳/۷۰ درصد) و بازیافت پروتئینی و خاصیت آن‌تی اکسیدانی بالاتری (۸۲/۰۲ درصد) تولید کند و افزایش زمان هیدرولیز تاثیر مثبتی بر ویژگی‌های مذکور داشت (۰/۰۵ < p). نتایج مربوط به ویژگی‌های کیفی ناگت نشان داد که افزودن آلژینات، صمغ دانه شاهی و پروتئین هیدرولیز شده سبب کاهش جذب روغن (۱۲/۱۵ درصد) و افزایش رطوبت، درصد پوشش دهی و راندمان سرخ کردن و نرمی بافت (۷/۴۱ درصد) ناگت ماهی سرخ شده، شد. همچنین پوشش آلژینات، صمغ دانه شاهی و پروتئین هیدرولیز شده روند فساد اکسیداسیونی را در ناگت به طور معنی‌داری به تعویق انداخت و عمر ماندگاری ناگت را افزایش داد (۰/۰۵ < p) و با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده، نتایج بهتری مشاهده شد (۰/۰۵ < p). به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پوشش ترکیبی آلژینات (۲ درصد)، صمغ دانه شاهی (۱ درصد) به همراه پروتئین هیدرولیز شده دانه چیا در سطح ۱ درصد (هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه)، نقش به‌سزایی در بهبود ویژگی‌های کیفی ناگت سرخ شده و افزایش ماندگاری آن طی دوره نگهداری دارد.

کلمات کلیدی: آلژینات، صمغ دانه شاهی، اکسیداسیون لیپید، جذب روغن، دانه چیا

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

امروزه بخش عمده مواد غذایی مورد نیاز جامعه به صورت صنعتی تولید و به صورت آماده مصرف، به بازار عرضه می‌شوند. محصولات آماده مصرف با توجه به برآورده ساختن نیازهای مصرف کنندگان مانند خواص حسی مطلوب و سرعت آماده سازی بالا، جایگاه ویژه‌ای را در سبد غذایی خانواده و جامعه به دست آوردند. ناگت ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) محصول جدیدی در کشور است که به دلیل دارا بودن طعم و مزه مطلوب می‌تواند با بالا بردن تقاضای مصرف میزان سرانه فرآورده‌های دریایی را افزایش دهد. غذاهای آماده، نیمه آماده و محصولات سوخاری، بخش عمده‌ای از محصولات آماده به مصرف را تشکیل می‌دهند (Ojagh *et al.*, 2018). از مزایای ناگت ماهی می‌توان به بافت ترد، ظاهر، رنگ مطلوب و بهبود کیفیت خوراکی اشاره نمود (Sanez *et al.*, 2008). سرخ کردن عمیق از روش‌های رایج فرآوری مواد غذایی است که شامل پختن ماده غذایی در روغن داغ در دمایی بالاتر از نقطه جوش آب است (Chen *et al.*, 2009). هدف از این فرایند، فرآوری سریع ماده غذایی به منظور افزایش مدت زمان نگهداری، ضمن ایجاد ویژگی‌های منحصر به فرد بافتی، رنگ، عطر و طعم دلپذیر است (Freitas *et al.*, 2009). از جمله روش‌های کاهش جذب روغن طی سرخ کردن عمیق مواد غذایی پوشش‌دهی با هیدروکلوئیدها نظیر پوشش‌های خوراکی، صمغ‌ها و استفاده از پپتیدهای زیست فعال از منابع گیاهی است. دانه شاهی (*Lepidium sativum*) از خانواده Cruciferae حاوی ۲۵/۵ درصد روغن و ترکیباتی چون سیناپیک اسید، کولین‌اتر، آلکالوئید و اسانس روغنی است که به دلیل ویژگی رئولوژیک^۱ و سهولت استخراج، محققان سعی در به کار بردن آن به عنوان عامل تغلیظ کننده و ژل کننده در صنعت غذا داشته‌اند (Karazhiyan *et al.*, 2009). بذر چیا (*Salvia hispanica*) به دلیل سطح بالای پروتئین، آنتی‌اکسیدان، فیبر غذایی، ویتامین‌ها، مواد معدنی به‌ویژه به دلیل روغن آن حاوی بیشترین مقدار اسید آلفا لینولئیک یا امگا ۳ نسبت به سایر منابع دارای ارزش بالایی هستند و به

عنوان عامل تغلیظ کننده و ژل کننده در صنعت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند. مصرف کنندگان مواد غذایی فرموله شده با صمغ دانه چیا را به‌خوبی می‌پذیرند. میزان پروتئین دانه‌های چیا ۲۳-۱۵ درصد است و شامل همه اسید آمینه‌های ضروری به‌ویژه گلوتامیک اسید، آرژنین، آسپارتیک اسید، آلانین، فنیل آلانین، لوسین، سرین است (Marineli *et al.*, 2014). هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها یکی از روش‌های بهبود خصوصیات پروتئین‌هاست. این فرایند می‌تواند با استفاده از آنزیم‌ها با منشأ داخلی (فرایند اتولیز) و آنزیم‌های تجاری انجام گیرد. مهم‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر شامل: (۱) آنزیم Alcalase که یک پروتئاز غیر اختصاصی میکروبی و قلیایی با فعالیت کاتالیتیک بالاست که باکتری *Bacillus licheniformis* آن را تولید می‌کند و به میزان فعالیت ۲/۴ آنسون به ازاء هر میلی‌لیتر و (۲) آنزیم Flavourzyme که یک آنزیم مایع، به رنگ قهوه‌ای تیره که دارای فعالیت اگزوپپتیدازی به میزان فعالیت ۱/۵ آنسون به ازاء هر میلی‌لیتر است، بودند (Oveysipour *et al.*, 2012). بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از هیدرولیز آنزیمی دانه چیا به‌وسیله آنزیم‌های Alcalase و Flavourzyme به تفکیک، به همراه پوشش ترکیبی (آلژینات، صمغ دانه شاهی) بر خواص فیزیکیوشیمیایی و حسی ناگت ماهی بود.

مواد و روش کار

آماده‌سازی مواد اولیه

دانه چیا با نام تجاری (A.B) از فروشگاه زنجیره‌ای آرین خریداری شد. آنزیم Alcalase استخراجی از باکتری *Bacillus licheniformis* و آنزیم Flavourzyme استخراجی از قارچ *Aspergillus oryzae* از شرکت Novozymes (دانمارک) تهیه و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آلژینات از شرکت Merck (آلمان) و دانه شاهی از شرکت ریحان گام پارسین تهیه شد.

(شاخه‌ای از فیزیک که به تغییر شکل و جریان ماده می‌پردازد). Rheology^۱

آماده سازی ماهی

ماهی فیتوفاگ از استخرهای پرورشی کپور استان مازندران تهیه و به پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (شهرستان ساری)، همراه با یخ به نسبت ۱ به ۱ منتقل شد. پس از شستشوی ماهی و جداسازی سر و دم و امعاء و احشاء، برای گوشت گیری به سالن تولید منتقل شد. فیله کردن به صورت دستی انجام شد، سپس به کمک دستگاه چرخ گوشت با قطر منفذ استوانه ۳ میلی متر تبدیل به (گوشت چرخ کرده ماهی) شدند.

میزان پروتئین و ایزوله پروتئین از دانه چیا

به روش کجلدال نمونه ها هضم و سپس با تیتراسیون مقدار ($N \times 6/25$) مقدار کل پروتئین رسوبی در فاز آبی محاسبه شد (Villanueva-Lazo *et al.*, 2022). دانه چیا پس از تمیز شدن به منظور غیر فعال سازی آنزیم های آن، تحت دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و سپس به مدت ۸ ساعت توسط n-هگزان چربی زدایی شد و در دمای اتاق خشک شد. دانه چیا فاقد چربی با استفاده آسیاب چکشی آزمایشگاهی آسیاب شد. آرد دانه چیا فاقد چربی در محلول ۱ مول در لیتر نمک طعام (۱:۸ w/v) در دمای محیط برای ۳۰ دقیقه همزده شد و سپس pH آن روی ۹/۵ با استفاده از ۱ مول در لیتر کلرید سدیم، تنظیم و بعد از ۳۰ دقیقه همزدن، سوسپانسیون در ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی در pH=۴ با استفاده از ۱ مول در لیتر کلرید سدیم برای رسوب پروتئین ها تنظیم شد و دوباره در ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ شد. رسوبات چندین بار با آب مقطر شسته شده و در آب مقطر حاوی هیدروکسید سدیم (NaOH) تا pH=۷ تنظیم و ذرات پراکنده با استفاده از خشک کن انجمادی خشک شد (Zhou *et al.*, 2006).

هیدرولیز ایزوله پروتئینی حاصل از دانه چیا

در مطالعه حاضر، ۶ تیمار در ارتباط با آزمون های مربوط به هیدرولیز ایزوله پروتئینی دانه چیا انتخاب شدند. تیمار ۱: Flavourzyme+۱۰ دقیقه زمان هیدرولیز، تیمار ۲: Flavourzyme+۲۰ دقیقه زمان هیدرولیز، تیمار ۳: Flavourzyme+۳۰ دقیقه زمان هیدرولیز، تیمار ۴: Alcalase+۱۰ دقیقه زمان هیدرولیز، تیمار ۵: Alcalase+۲۰ دقیقه زمان هیدرولیز و تیمار ۶: Alcalase+۳۰ دقیقه زمان هیدرولیز، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد و سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیم ها (Alcalase ۸/۵، Flavourzyme ۷)، رسانده شد. نمونه ها در حمام آبی متحرک در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه شد پروتئین های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع شناور جمع آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی به صورت پودر در آمد. درجه هیدرولیز براساس میزان α آمینو اسید در میزان پروتئین نمونه محاسبه شد (Villanueva-Lazo *et al.*, 2022). برای اندازه گیری طول تقریبی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم های مختلف، از درجه هیدرولیز برای محاسبه طول زنجیره به کمک فرمول ذیل استفاده گردید (Chatterjee *et al.*, 2015). درجه هیدرولیزاسیون ۱۰۰/ = طول زنجیره پپتیدی

میزان باز یافت پروتئینی

میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت نمونه محلول به روش بیورت تعیین شد (He *et al.*, 2013):

$$100 \times (\text{میزان پروتئین موجود در نمونه} / \text{میزان پروتئین محلول موجود در پروتئین هیدرولیز شده}) = \text{باز یافت پروتئینی}$$

He و همکاران (۲۰۱۳) تعیین شد:

اندازه گیری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH

تعیین فعالیت پاک کنندگی رادیکال آزاد DPPH با روش

$$100 \times [(\text{میزان جذب کنترل} / \text{میزان جذب نمونه} - \text{میزان جذب کنترل}) - 1] = \text{درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد}$$

استخراج صمغ از دانه شاهی

دانه شاهی پس از خریداری، برای حذف مواد خارجی نظیر خار و خاشاک، سنگ، دانه‌های شکسته و کاه، به شیوه دستی تمیز گردید. صمغ به روش Karazhiyan و همکاران (۲۰۱۱) استخراج شد.

مواد مورد استفاده در روکش

برای آردزنی اولیه در روکش، از آرد گندم با مقدار درصد پوشش‌های متفاوت استفاده شد. فرمول لعاب طبق فرمولاسیون Chen و همکاران (۲۰۰۹) تهیه گردید که شامل ۵۵ درصد آرد گندم، ۳۰ درصد آرد نشاسته اکسید شده، ۱۰ درصد آرد گلوتن، ۲ درصد بیکینگ پودر و ۳ درصد نمک بود قسمت نهایی روکش از آرد سوخاری نارنجی رنگ و با اندازه‌ی ذرات متوسط استفاده شد.

آماده‌سازی ناگت ماهی فیتوفاگ

با توجه به فرمولاسیون ناگت ماهی فیتوفاگ به روش Asadi Farsani (۲۰۱۸)، سرخ کردن با استفاده از روغن آفتابگردان به مدت ۱ دقیقه در سرخ کن تحت دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به روش عمیق انجام گرفت، تکرارهای هر تیمار جداگانه درون بسته‌های زیپ کیپ بسته بندی شده و در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید. همچنین غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده دانه چیا در دو سطح (۰/۵ و ۱ درصد) به فرمولاسیون اولیه ناگت افزوده شد. پس از آماده شدن ناگت و تهیه تیمارهای مختلف، آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی، بافتی و حسی بر آن انجام شد.

سنجش درصد رطوبت

رطوبت با روش خشک کردن در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (Avak and Glaser, 2005) و عمل خشک شدن تا زمانی ادامه یافت که تغییر وزن محسوسی در نمونه دیده نشد و میزان رطوبت از رابطه ذیل مورد محاسبه قرار گرفت:

$$100 \times (\text{وزن اولیه} / \text{وزن بوته چینی} - \text{وزن نهایی}) = \text{درصد رطوبت}$$

اندازه‌گیری میزان روغن جذب شده

استخراج و اندازه‌گیری چربی بر طبق روش استاندارد Avak و Glaser (۲۰۰۵) با استفاده از روش سوکسله انجام گرفت.

آزمون بافت‌سنجی

آزمون سنجش بافت نمونه با استفاده از دستگاه بافت‌سنج Instron طبق روش Das و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد.

درصد پوشش‌دهی ناگت

درصد پوشش‌دهی به کمک رابطه ذیل محاسبه شد (Darai Garmkhane et al., 2009):

$$CP(\%) = \frac{C - I}{I} \times 100$$

راندمان سرخ کردن

راندمان سرخ کردن به کمک رابطه ذیل محاسبه شد (Darai Garmkhane et al., 2009):

$$I(\%) = \frac{F}{NF} \times 100$$

اندازه‌گیری پراکسید

نمونه‌ای از روغن استخراجی از ناگت ماهی را در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری سر سمباده‌ای وزن شده و حدود ۲۵ میلی‌لیتر از محلول اسیداستیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۲:۳) به محتویات ارلن اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول یدورپتاسیم اشباع، ۳۰ میلی‌لیتر از آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته یک درصد به مجموعه افزوده شده و مقدار ید آزاد شده با محلول تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تیترو گردید (Ronald and Ronald, 1991):

وزن نمونه روغن/۱۰۰ × نرمالیت × حجم مصرفی تیوسولفات = PV

اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید (TBA)^۱

اندازه‌گیری TBA به وسیله روش رنگ‌سنجی صورت گرفت. سپس مقدار جذب (As) در ۵۳۲ نانومتر در مقابل شاهد، آب مقطر (Ab) خوانده شد. مقدار TBA میلی‌گرم

^۱ Thiobarbituric acid (TBA)

میزان پروتئین اولیه دانه چیا برابر با $1/00 \pm 23/91$ درصد و میزان پروتئین اولیه ایزوله پروتئین دانه چیا برابر با $40/1 \pm 82/24$ درصد بود.

تعیین مقادیر درجه هیدرولیز در تیمارهای مختلف

اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان درجه هیدرولیز در بین نمونه‌های هیدرولیز شده تحت تاثیر آنزیم و زمان‌های مختلف مشاهده شد ($p < 0/05$) به‌طوری‌که درجه هیدرولیز به‌وسیله آنزیم Alcalase بیشتر از آنزیم Flavourzyme بود ($P < 0/05$) و با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر درجه هیدرولیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$) (جدول ۱).

تعیین مقادیر بازیافت پروتئینی در تیمارهای مختلف

اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان بازیافت پروتئینی در بین نمونه‌های هیدرولیز شده تحت تاثیر آنزیم و زمان‌های مختلف مشاهده شد ($p < 0/05$) به‌طوری‌که بازیافت پروتئینی به‌وسیله آنزیم Alcalase بیشتر از آنزیم Flavourzyme بود ($p < 0/05$) و با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر بازیافت پروتئینی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$) (جدول ۲).

تعیین طول زنجیره پپتیدی در تیمارهای مختلف

اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان طول زنجیره پپتیدی در بین نمونه‌های هیدرولیز شده تحت تاثیر آنزیم و زمان‌های مختلف مشاهده شد ($p < 0/05$) به‌طوری‌که طول زنجیره پپتیدی به‌وسیله آنزیم Alcalase کمتر از آنزیم Flavourzyme بود ($p < 0/05$) و همچنین با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر طول زنجیره پپتیدی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$) (جدول ۳).

تعیین مقادیر پروتئین در تیمارهای مختلف

اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان پروتئین در بین نمونه‌های هیدرولیز شده تحت تاثیر آنزیم و زمان‌های مختلف مشاهده شد ($p < 0/05$) به‌طوری‌که پروتئین به‌وسیله آنزیم Alcalase بیشتر از آنزیم Flavourzyme بود ($p < 0/05$) و با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر پروتئین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$) (جدول ۴).

مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم بافت ناگت بر اساس رابطه ذیل محاسبه گردید (Hedayatifard and Miri, 2017):

$$TBA = (As - Ab) \times 200/50$$

As: مقدار جذب، Ab: آب مقطر

اندازه‌گیری مجموع بازهای نیتروژنی فرار

شاخص TVB-N به روش Kjeldahl انجام گرفت. با قرار دادن میزان اسید مصرفی برای تیتراسیون در رابطه ذیل بازهای نیتروژنی فرار بر حسب میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ناگت ماهی، محاسبه شد (Avak and Glaser, 2005):

$$TVB-N = \text{وزن نمونه} / 100 \times 1/4 \times \text{میزان اسید سولفوریک مصرفی}$$

آزمون حسی

ارزیابی ویژگی‌های حسی نمونه‌های ناگت ماهی فیتوفاگ با استفاده از آزمون Hedonic پنج نقطه‌ای^۱ بررسی شد (Asadi Farsani, 2018).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، با استفاده از روش تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه^۲ در فاز اول و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، همچنین روش آنالیز واریانس دو طرفه^۳ در فاز دوم مربوط به تغییرات اکسیداتو در طول دوره نگهداری ناگت ماهی فیتوفاگ استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شده و تمام داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار (Spss version 18) و برای رسم نمودارها از Excel استفاده شد.

نتایج

اندازه‌گیری پروتئین اولیه دانه چیا و ایزوله پروتئین آن

¹ 5-Point Hedonic Scale Evaluation

² One-Way ANOVA

³ Two-Way ANOVA

جدول ۱: مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه چیا با استفاده از آنزیم‌های مختلف

Table 1: Degree of hydrolysis values of hydrolyzed (*Chia*) seed proteins using different enzymes

Hydrolysis time minutes	Enzyme	
	Alcalase	Flavourzyme
10	13.26±0.30 ^{Ac}	10.26±0.27 ^{Bc}
20	19.10±1.09 ^{Ab}	15.53±0.53 ^{Bb}
30	22.19±0.30 ^{Aa}	18.10±0.13 ^{Ba}

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (A, B)

(۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (a, b, c,...)

All data are presented as percentages (mean ± SD)

Values in the same row with different superscripts (A, B) differ significantly.

Values in the same column with different superscript letters (a, b, c, ...) differ significantly.

جدول ۲: مقادیر بازیافت پروتئینی، پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه چیا با استفاده از آنزیم‌های مختلف

Table 2: Protein recovery values of hydrolyzed (*Chia*) seed proteins using different enzymes

Hydrolysis time minutes	Enzyme	
	Alcalase	Flavourzyme
10	19.37±0.21 ^{Ac}	16.32±0.15 ^{Bc}
20	21.28±0.36 ^{Ab}	18.16±0.30 ^{Bb}
30	22.95±0.21 ^{Aa}	19.84±0.34 ^{Ba}

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (A, B)

(۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (a, b, c,...)

All data are presented as percentages (mean ± SD)

Values in the same row with different superscripts (A, B) differ significantly.

Values in the same column with different superscript letters (a, b, c, ...) differ significantly.

جدول ۳: مقادیر طول زنجیره پپتیدی پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه چیا با استفاده از آنزیم‌های مختلف

Table 3: Peptide chain length values of hydrolyzed (*Chia*) seed proteins using different enzymes

Hydrolysis time minutes	Enzyme	
	Alcalase	Flavourzyme
10	9.01±0.11 ^{Ba}	11.94±0.55 ^{Aa}
20	5.70±0.16 ^{Bb}	7.91±0.37 ^{Ab}
30	4.64±0.11 ^{Bc}	6.34±0.40 ^{Ac}

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (A, B)

(۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (a, b, c,...)

All data are presented as percentages (mean ± SD)

Values in the same row with different superscripts (A, B) differ significantly.

Values in the same column with different superscript letters (a, b, c, ...) differ significantly.

هیدرولیز مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت

($p < 0.05$) به‌طوری‌که پروتئین هیدرولیز شده به‌وسیله آنزیم

Alcalase با زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه دارای بالاترین

فعالیت آنتی-اکسیدانی بود (۸۲/۰۲ درصد) ($p < 0.05$)

(شکل ۱).

فعالیت رادیکال آزاد DPPH

فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به‌وسیله آنزیم

Alcalase در اکثر زمان‌های هیدرولیز بالاتر بود ($p < 0.05$).

میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH در بین زمان‌های مختلف

اختلاف معنی‌داری باهم داشتند ($p < 0.05$) با افزایش زمان

مقادیر جذب روغن در ناگت سرخ شده

با توجه به نتایج بیشترین مقادیر جذب روغن در تیمار شاهد مشاهده شد (۱۹/۷۶ درصد) ($p < 0.05$). افزودن آلزینات + صمغ دانه شاهی باعث کاهش جذب روغن شد و با افزودن پروتئین هیدرولیز شده، مقادیر جذب روغن کمتری مشاهده

شد. کمترین مقادیر جذب روغن در تیمار آلزینات + صمغ + پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد مشاهده شد (۱۲/۱۵ درصد) ($p < 0.05$) (شکل ۲).

جدول ۴: مقادیر پروتئین، پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه چیا با استفاده از آنزیم‌های مختلف

Table 4: Protein values, hydrolyzed proteins of (*Chia*) seeds using different enzymes

Hydrolysis time minutes	Enzyme	
	Alcalase	Flavourzyme
10	79.09±0.87 ^{Ac}	66.62±0.63 ^{Bc}
20	86.90±1.47 ^{Ab}	74.14±1.24 ^{Bb}
30	93.70±0.88 ^{Aa}	81.00±1.36 ^{Ba}

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

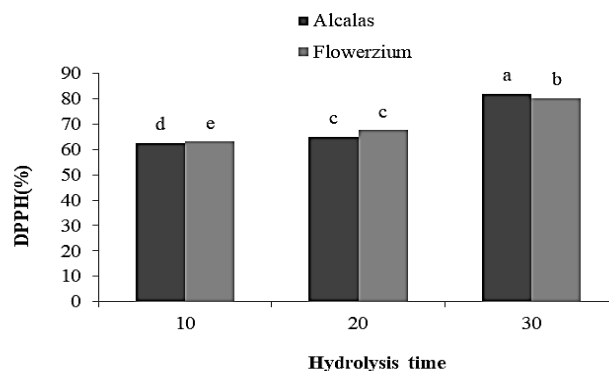
(۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (A, B)

(۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (a, b, c,...)

All data are presented as percentages (mean ± SD)

Values in the same row with different superscripts (A, B) differ significantly.

Values in the same column with different superscript letters (a, b, c, ...) differ significantly.



حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

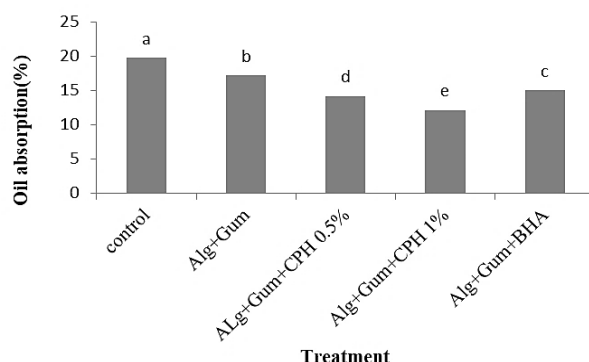
Different letters in each row indicate significant differences between the data

حروف یکسان در هر ردیف نشان می دهد داده ها تفاوت آماری معنی داری با یکدیگر ندارند.

Identical letters in each row indicate that the data are not significantly different from each other

شکل ۱: فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) پروتئین هیدرولیز شده به وسیله آنزیم های flowerzyme و alcalase

Figure 1: Antioxidant activity (DPPH) of protein hydrolyzed by alcalase enzyme and flowerzyme enzyme



حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

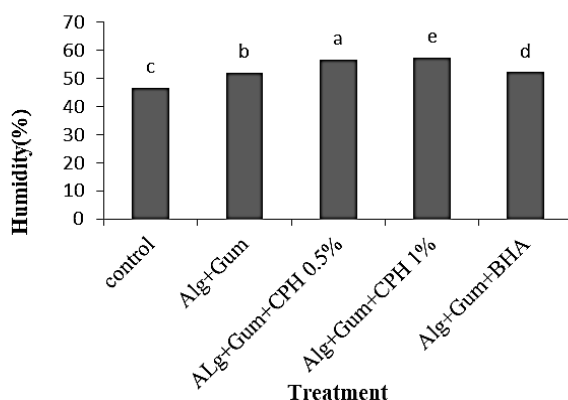
شکل ۲: میزان جذب روغن در تیمارهای مختلف ناگت سرخ شده ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

Figure 2: Oil absorption rate in different treatments of fried phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys molitrix*)

پروتئین هیدرولیز شده مقادیر رطوبت بیشتری مشاهده شد. بیشترین مقادیر رطوبت در تیمارهای آلژینات + صمغ + پروتئین هیدرولیز شده ۰/۵ و ۱ درصد مشاهده شد (به ترتیب ۵۶/۸۴ و ۵۷/۴۵ درصد) ($p < 0.05$) (شکل ۳).

مقادیر جذب رطوبت در ناگت سرخ شده

با توجه به نتایج کمترین مقادیر رطوبت در تیمار شاهد مشاهده شد (۴۶/۷۷ درصد) ($p < 0.05$). افزودن آلژینات + صمغ دانه شاهی باعث افزایش میزان رطوبت شد و با افزودن



حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

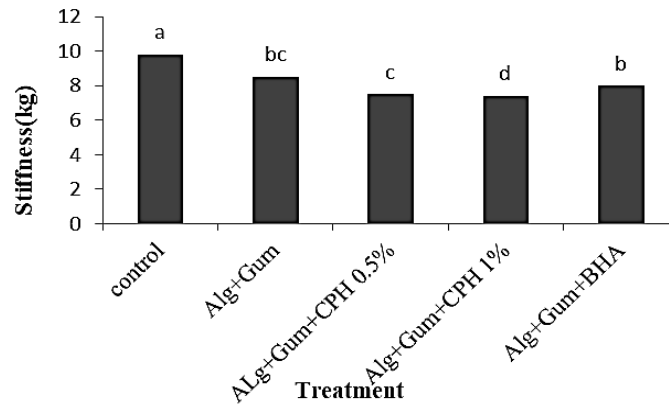
شکل ۳: میزان رطوبت در تیمارهای مختلف ناگت سرخ شده ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

Figure 3: Moisture content in different treatments of fried phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys molitrix*)

افزودن پروتئین هیدرولیز شده، مقادیر سفتی بافت کمتری مشاهده شد. کمترین مقادیر سفتی بافت در تیمار آلژینات + صمغ + پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد مشاهده شد (۷/۴۱ درصد) ($p < 0.05$) (شکل ۴).

مقادیر سفتی بافت در ناگت سرخ شده

با توجه به نتایج، بیشترین مقادیر سفتی بافت در تیمار شاهد مشاهده شد (۹/۱۸ درصد) ($p < 0.05$). افزودن آلژینات + صمغ دانه شاهی باعث کاهش سفتی بافت شد و با



شکل ۴: سفتی بافت در تیمارهای مختلف ناگت سرخ شده ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

Figure 4: Tissue firmness in different treatments of fried phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys molitrix*)

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

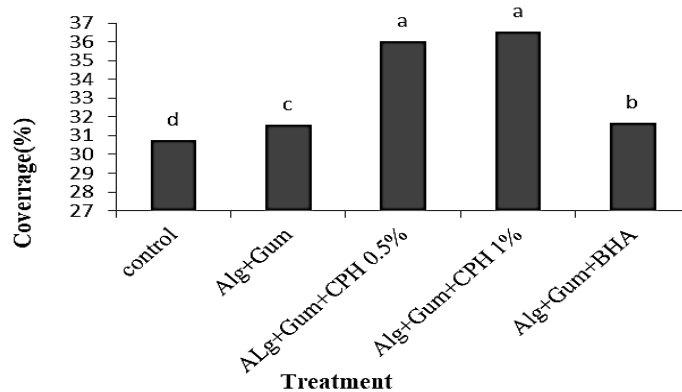
حروف یکسان در هر ردیف نشان می دهد داده ها تفاوت آماری معنی داری با یکدیگر ندارند

Identical letters in each row indicate that the data are not significantly different from each other

بیشتری مشاهده شد. بیشترین مقادیر پوشش دهی در تیمارهای آلژینات+صمغ+پروتئین هیدرولیز شده ۰/۵ و ۱ درصد مشاهده شد (به ترتیب ۳۶/۰۵ و ۳۶/۵۴ درصد) ($p < 0.05$) (شکل ۵).

مقادیر پوشش دهی در ناگت سرخ شده

با توجه به نتایج، کمترین مقادیر پوشش دهی در تیمار شاهد مشاهده شد (۳۰/۷۵ درصد) ($p < 0.05$). افزودن آلژینات+صمغ دانه شاهی باعث افزایش میزان پوشش دهی شد و با افزودن پروتئین هیدرولیز شده، مقادیر پوشش دهی



حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

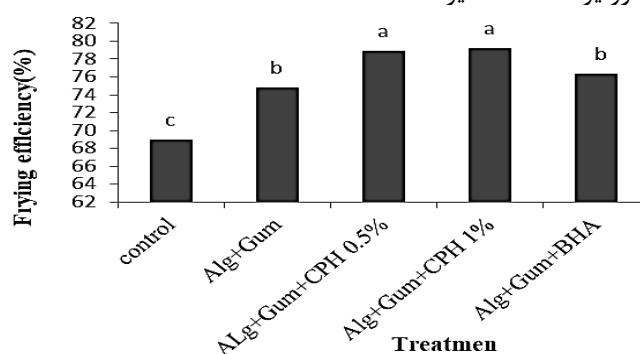
شکل ۵: پوشش دهی در تیمارهای مختلف ناگت سرخ شده ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

Figure 5: Coating in different treatments of fried phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مقادیر راندمان سرخ کردن در ناگت سرخ شده

با توجه به نتایج، کمترین مقادیر راندمان سرخ کردن در تیمار شاهد مشاهده شد (۶۹/۰۱ درصد) ($p < 0.05$). افزودن آلژینات+صمغ دانه شاهی باعث افزایش میزان راندمان سرخ کردن شد و با افزودن پروتئین هیدرولیز شده، مقادیر

راندمان سرخ کردن بیشتری مشاهده شد. بیشترین مقادیر راندمان سرخ کردن در تیمارهای آلژینات+صمغ+پروتئین هیدرولیز شده ۰/۵ و ۱ درصد مشاهده شد (به ترتیب ۷۸/۹۳ و ۷۹/۲۴ درصد) ($p < 0.05$) (شکل ۶).



حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

شکل ۶: راندمان سرخ کردن در تیمارهای مختلف ناگت سرخ شده ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)

Figure 6: Frying efficiency in different treatments of fried phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys molitrix*)

تغییرات مقادیر عدد پراکسید طی مدت نگهداری

نتایج آزمون مربوط مقادیر عدد پراکسید نشان داد که تغییرات عدد پراکسید تحت تاثیر زمان و تیمار است. با افزایش زمان، میزان عدد پراکسید در تمامی تیمارها به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل آماری، تیمارهای مختلف در روز صفر نگهداری اختلاف معنی داری با هم نداشتند ($p > 0.05$). اما در سایر روزهای نگهداری، افزودن نگهدارنده ها سبب کند

شدن روند افزایشی عدد پراکسید شده و با افزودن پروتئین هیدرولیز شده، نتایج بهتری مشاهده شد. همچنین افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده تاثیر مثبتی بر کند کردن روند افزایشی عدد پراکسید داشت ($p < 0.05$) به طوری که بیشترین مقادیر در تیمار شاهد و کمترین مقادیر در تیمار آلژینات+صمغ+پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد مشاهده شد ($p < 0.05$) (جدول ۵).

جدول ۵: مقادیر پراکسید در تیمارهای مختلف ناگت ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys nobilis*) طی مدت زمان نگهداری

(میلی اکی والان / کیلوگرم چربی)

Table 5: Peroxide levels in different treatments of phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys nobilis*) during storage (milliequivalents/kg fat)

Treatment	Holding time (days)				
	0	4	8	12	16
Control	0.99±0.02 ^{Ae}	98±0.13 ^{Ac}	7.48±0.18 ^{Ac}	8.83±0.08 ^{Ab}	9.45±0.1 ^{Ae}
Alg+Gum	0.97±0.05 ^{Ae}	0.5±0.06 ^{Bd}	5.76±0.12 ^{Bc}	6.41±0.32 ^{Bb}	7.66±0.13 ^{Ba}
Alg+Gum+CPH 0.5%	0.99±0.04 ^{Ae}	23±0.04 ^{Cd}	4.62±0.07 ^{Cc}	5.77±0.18 ^{Cb}	6.56±0.18 ^{Ca}
Alg+Gum+CPH 1%	0.98±0.05 ^{Ae}	67±0.12 ^{Dd}	3.9±0.04 ^{Ec}	4.41±0.02 ^{Ec}	5.34±0.1 ^{Ea}
Alg+Gum+BHA	0.98±0.03 ^{Ae}	52±0.08 ^{Dd}	5.13±0.12 ^{Db}	5.13±0.12 ^{Ea}	5.95±0.07 ^{Da}

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

حروف یکسان در هر ردیف نشان می دهد داده ها تفاوت آماری معنی داری با یکدیگر ندارند

Identical letters in each row indicate that the data are not significantly different from each other

هیدرولیز شده سبب کند شدن روند افزایشی عدد تیوباربیتیک اسید شد. همچنین افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده، تاثیر مثبتی بر کند کردن روند افزایشی تیوباربیتیک اسید داشت ($p < 0.05$) به طوری که بیشترین مقادیر در تیمار شاهد و کمترین مقادیر در تیمار آلزینات+صمغ+پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد مشاهده شد ($p < 0.05$) (جدول ۶).

تغییرات مقادیر تیوباربیتیک اسید طی مدت نگهداری

با افزایش زمان میزان مقادیر تیوباربیتیک اسید در تمامی تیمارها به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل آماری، تیمارهای مختلف در روز صفر نگهداری اختلاف معنی داری با هم نداشتند ($p > 0.05$). اما در سایر روزهای نگهداری، افزودن نگهدارنده ها و پروتئین

جدول ۶: مقادیر تیوباربیتیک اسید در تیمارهای مختلف ناگت ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys nobilis*) طی مدت زمان

نگهداری (میلی گرم مالون دی آلدئید/کیلوگرم چربی)

Table 6: Thiobarbituric acid levels in different treatments of phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys nobilis*) during storage (mg malondialdehyde/kg fat)

Treatment	Holding time (days)				
	0	4	8	12	16
Control	0.85±0.04 ^{Ae}	2±0.11 ^{Ad}	3.56±0.04 ^{Ac}	4.06±0.05 ^{Ab}	5.14±0.1 ^{Aa}
Alg+Gum	0.84±0.05 ^{Ae}	1.61±0.07 ^{Bd}	2.25±0.1 ^{Bc}	3.14±0.06 ^{Bb}	4±0.14 ^{Ba}
Alg+Gum+CPH 0.5%	0.84±0.02 ^{Ae}	1.32±0.03 ^{Cd}	1.84±0.09 ^{Cc}	2.33±0.07 ^{Db}	2.98±0.03 ^{Ca}
Alg+Gum+CPH 1%	0.8±0.05 ^{Ae}	1.13±0.03 ^{Dd}	1.49±0.05 ^{Dc}	1.98±0.03 ^{Eb}	2.61±0.03 ^{Da}
Alg+Gum+BHA	0.8±0.05 ^{Ae}	1.19±0.05 ^{Dd}	1.88±0.04 ^{Cc}	2.49±0.06 ^{Cb}	3.10±0.06 ^{Ca}

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

حروف یکسان در هر ردیف نشان می دهد داده ها تفاوت آماری معنی داری با یکدیگر ندارند

Identical letters in each row indicate that the data are not significantly different from each other

جدول ۷: مقادیر بازهای نیتروژنی فرار در تیمارهای مختلف ناگت ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys nobilis*) طی مدت زمان

نگهداری (میلی گرم/صدگرم)

Table 7: Volatile nitrogenous base levels in different treatments of phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys nobilis*) during storage (mg/100g)

Treatment	Holding time (days)				
	0	4	8	12	16
Control	11.22±0.38 ^{Ae}	23.7±0.36 ^{Ad}	34.06±1.14 ^{Ac}	40.86±1.12 ^{Ab}	47.05±0.51 ^{Aa}
Alg+Gum	11.26±0.25 ^{Ae}	18.41±0.93 ^{Bd}	26.5±0.77 ^{Bc}	31.27±1.99 ^{Bb}	39.58±0.65 ^{Ba}
Alg+Gum+CPH 0.5%	11.08±0.15 ^{Ae}	15.91±0.14 ^{Cd}	23.36±0.57 ^{Cc}	27.73±0.65 ^{Cb}	31.65±0.64 ^{Da}
Alg+Gum+CPH 1%	11.12±0.19 ^{Ae}	15.28±0.27 ^{Cd}	19.51±0.48 ^{Dc}	24.55±0.6 ^{Db}	30.48±0.65 ^{Da}
Alg+Gum+BHA	11.07±0.15 ^{Ae}	15.03±0.23 ^{Cd}	20.11±0.77 ^{Dc}	29.26±0.3 ^{Cb}	34.52±1.03 ^{Ca}

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

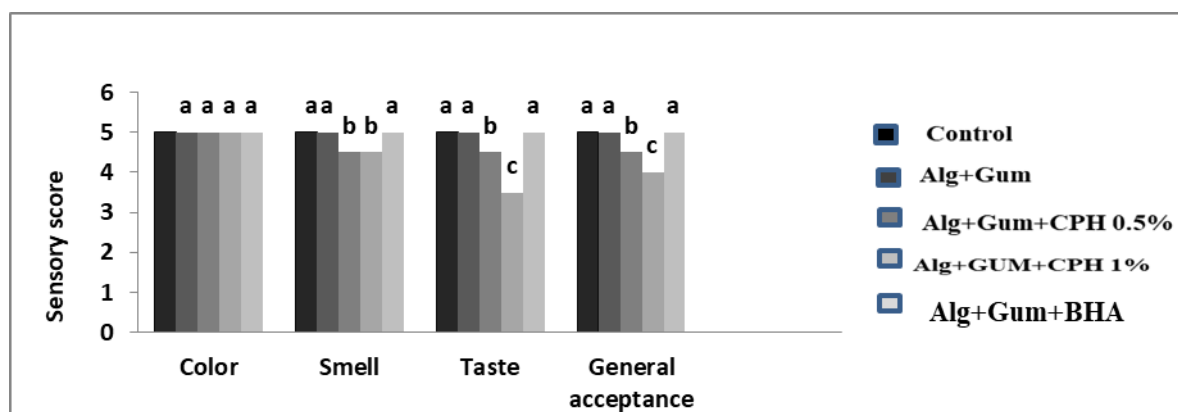
حروف یکسان در هر ردیف نشان می دهد داده ها تفاوت آماری معنی داری با یکدیگر ندارند

Identical letters in each row indicate that the data are not significantly different from each other

ارزیابی حسی تیمارهای مختلف در ابتدای دوره نگهداری

در شکل ۷، نتایج ارزیابی حسی نشان داده شده است. تمامی

تیمارها ارزیابی شدند. امتیاز حسی تیمار آلژینات+صمغ+پروتئین هیدرولیز شده ۰/۵ و ۱ درصد، کمتر از سایر تیمارها بود ($p < 0.05$) (شکل ۷).



شکل ۷: ارزیابی حسی تیمارهای مختلف ناگت سرخ شده ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys nobilis*)

Figure 7: Sensory evaluation of different treatments of fried phytophagous fish nuggets (*Hypophthalmichthys nobilis*)

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد

Different letters in each row indicate significant differences between the data

حروف یکسان در هر ردیف نشان می دهد داده ها تفاوت آماری معنی داری با یکدیگر ندارند

Identical letters in each row indicate that the data are not significantly different from each other

بحث

معنی داری کاهش یافت. نتایج مربوط به بازیافت پروتئینی، پروتئین و درجه هیدرولیز در مطالعه حاضر باهم، همخوانی داشت. افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر بازیافت پروتئین و میزان پروتئین افزایش یافت و آنزیم Alcalase، آنزیم موثرتری نسبت به سایر آنزیم ها بود (Oveysipour et al., 2013). نتایج مربوط به فعالیت به رادیکال آزاد DPPH نشان داد که ایجاد فعالیت آنتی اکسیدانی نتیجه هیدرولیز پروتئین ها و ایجاد پپتیدهای مختلف با توالی آمینو اسیدهای مختلف است که آمینو اسیدها با ترکیبات حلقوی می توانند به ترکیبات رادیکال دارای کمبود الکترون، پروتون دهند و از اکسیداسیون جلوگیری کنند (He et al., 2013). نتایج مربوط به مقادیر جذب روغن در ناگت سرخ شده نشان داد که پوشش های هیدروکلوئیدی با تشکیل شبکه ژل و حفظ این شبکه طی فرایند سرخ کردن کاهش می یابد (Bahrami and Khadmi, 2020). جذب روغن به شدت تحت تأثیر حلالیت و آبگریزی سطح پروتئین قرار می گیرد و به دلیل توانایی پروتئین دانه چیا برای اتصال بین آب و

درجه هیدرولیز یکی از مهم ترین شاخص های بررسی خواص پروتئین های هیدرولیز شده است که میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی را بیان می کند. در بررسی تعیین مقادیر درجه هیدرولیز مشخص شد، میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده، وابسته به شدت و درجه هیدرولیز است. اثر دما و زمان نیز بر آن تأثیر مهمی دارد (Sheykhnezhad et al., 2017). اثر زمان بر هیدرولیز پروتئین، با افزایش زمان واکنش، هیدرولیز آنزیمی با یک فاز سریع آغاز می شود و در این مرحله تعداد بسیار زیادی از پیوندهای پپتیدی شکسته می شود. همچنین افزایش زمان فرایند موجب طولانی تر شدن فعالیت آنزیم و اثر آن بر سوستر می گردد (Yu et al., 2020). طول زنجیره پپتیدی با مقادیر درجه هیدرولیز نسبت عکس دارد (Nemati et al., 2019) به طوری که طول زنجیره پپتیدی به وسیله Alcalase کمتر از Flavourzyme بود و با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر طول زنجیره پپتیدی به طور

بنابراین، پروتئین هیدرولیز شده دانه چیا از توانایی سرکوب یا به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی در محصولات گوشتی برخوردارند (Mahdavi *et al.*, 2018) بررسی بازهای نیتروژنی فرار، با افزایش زمان، افزایش یافت. حضور باکتری‌ها در گوشت منجر به اتولیز پروتئین‌ها و تجزیه آنها، شکستن ترکیباتی از جمله تری‌متیل آمین اکسیدها، پپتیدها، آمینواسیدها و ... می‌شود. کمتر بودن میزان بازهای اتره فرار در تیمارهای (آلژینات+صمغ+پروتئین هیدرولیز شده ۰/۵ و ۱ درصد) را می‌توان به کاهش جمعیت باکتری تیمارهای مذکور یا کاهش توانایی اکسایشی باکتری‌ها در جدا کردن آمین‌ها از ترکیبات نیتروژنی غیرفرار یا هر دو عامل در نتیجه اثر پروتئین هیدرولیز شده بر باکتری‌های موجود در ناگت نسبت داد (Darocha *et al.*, 2018). از نتایج ارزیابی حسی در مطالعه حاضر، امتیاز حسی تیمار آلژینات+صمغ+پروتئین هیدرولیز شده ۰/۵ و ۱ درصد کمتر از سایر تیمارها بود. در مجموع، تمامی تیمارها مورد تایید ارزیاب‌ها بود (Bahrami and Khademi, 2020). نتایج نشان داد که پوشش آلژینات و صمغ دانه شاهی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود و پروتئین هیدرولیز شده دانه چیا سبب افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی آن گردید به‌طوری‌که پوشش آلژینات، صمغ دانه شاهی و پروتئین هیدرولیز شده، روند فساد اکسیداسیونی در ناگت را به طور معنی‌داری به تعویق انداخت و عمر ماندگاری ناگت را افزایش داد و در تمامی آزمون‌ها دارای اثری بهتر از نگهدارنده سنتزی BHA بود. بنابراین، ترکیب آلژینات (۲ درصد)، صمغ دانه شاهی (۱ درصد) و پروتئین هیدرولیز شده دانه چیا در سطح ۱ درصد (هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه)، می‌تواند پاسخگوی تقاضای روزافزون مصرف‌کنندگان برای فرآورده‌های دریایی سالم، باکیفیت و عاری از نگهدارنده‌های شیمیایی باشد.

منابع

Altunakar., B, Sahin., S. and Sumnu., G., 2006. Effects of hydrocolloids on apparent viscosity of batters and quality of chicken nuggets. *Chemical Engineering Communications*, 193(6):675–682. DOI:10.1080/00986440500194069

روغن و حلالیت بالای پروتئین هیدرولیز شده، مقادیر جذب روغن در این تیمار کاهش یافت (Mazloomi-Kiyapey *et al.*, 2019). نتایج مربوط به مقادیر سفتی بافت در ناگت سرخ‌شده نشان داد که بیشترین مقادیر سفتی بافت در تیمار شاهد مشاهده شد (۹/۱۸ درصد) و افزودن آلژینات+صمغ دانه شاهی باعث کاهش سفتی بافت شد و با افزودن پروتئین هیدرولیز شده مقادیر سفتی بافت کمتری مشاهده شد. کمترین مقادیر سفتی بافت در تیمار آلژینات+صمغ+پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد مشاهده شد (۷/۴۱ درصد). رطوبت بالا منجر به کاهش میزان سختی در بافت فرآورده سرخ‌شده می‌گردد. هیدروکلوئیدها به دلیل ظرفیت نگهداری آب موجب نرم شدن بافت ناگت می‌شوند و دریافتند که افزایش میزان پوشش‌دهی موجب نرم شدن بافت ناگت می‌گردد (Altunakar *et al.*, 2006). نتایج مربوط به مقادیر پوشش‌دهی در ناگت سرخ‌شده مشخص کرد که با افزایش غلظت هیدروکلوئیدها، میزان پوشش بیشتری به ناگت ماهی چسبیده شد. بنابراین، میزان درصد پوشش‌دهی افزایش یافت که با نتایج مطالعات Darai Garmkhaneh و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد. نتایج مربوط به مقادیر راندمان سرخ‌کردن در ناگت سرخ‌شده نشان داد، جذب بالای روغن طی سرخ کردن سبب فروپاشی بافت سلول نمونه می‌شود و راندمان سرخ‌کردن در این تیمارها به علت دارا بودن جذب روغن کمتر، راندمان سرخ‌شدن بالاتری دارد (Mokhtariyan and Tavakolipour, 2014). نتایج آزمون مربوط مقادیر عدد پراکسید نشان داد که پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر، نفوذپذیری بسیار کمی نسبت به اکسیژن و دی‌اکسیدکربن دارند. بنابراین، پوشش تشکیل‌شده روی سطح ناگت‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای نرخ تماس محصول را با اکسیژن کاهش می‌دهد که از سرعت اکسیداسیون اولیه چربی‌ها و متعاقب آن تشکیل هیدروپرواکسیدها کاسته می‌شود (Mohan *et al.*, 2012). نتایج مقادیر تیوباریوتیک اسید طی مدت نگهداری مشخص کرد، پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر، نفوذپذیری بسیار کمی نسبت به اکسیژن و دی‌اکسید کربن دارند. بنابراین، پوشش تشکیل‌شده روی سطح ناگت‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای نرخ تماس محصول را با اکسیژن کاهش می‌دهد که از سرعت اکسیداسیون اولیه چربی‌ها و متعاقب آن تشکیل هیدروپرواکسیدها کاسته می‌شود.

- Asadi Farsani, O., Kordjazi, M., Shabanpour, B., Ojagh, S.M. and Jamshidi, A., 2018.** The effect of antioxidant properties of brown algae (*Iyengaria stellata*) extract on the shelf-life and sensory properties of rainbow trout (*Oncorhynchus sykiss*) fillet nugget during frozen storage (-18°C), *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 7(17):149-166.
DOI:10.22101/JRIFST.2018.07.17.723. (In Persian)
- Avak, R. and Glaser, R., 2005.** Aereinfachtes verfahren zur vorher sage des lang zeitverhaltens von Holz-Beton-verbun dkonstru ktionen. *Journal of Zeitschrift Fur Den Gesamten Ingenieurbau*, 82(4):200-211
DOI:10.1002/bate.200590074
- Bahrami, S. and Khademi, D., 2020.** Effect of the nanoencapsulated sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract with carboxymethylcellulose on quality and shelf life of chicken nugget. *Food Science and Nutrition*, 8(7):3704-3715.
DOI:10.1002/fsn3.1656
- Chatterjee, R., Day, T.K., Ghosh, M. and Dhar, P., 2015.** Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. *Food and Bioproducts Processing*, 57(7):2586–2601.DOI:10.1007/s13197-020-04295-8
- Chen, S.D., Chen H.H., Chao Y.C. and Lin, R.S., 2009.** Effect of batter formula on qualities of deep-fat and microwave fried fish nuggets. *Journal of Food Engineering*, 95:359–364.
DOI:10.1016/j.jfoodeng.2009.05.016
- Daraei Garmehkhani, A., Mirzaei, H.A., Maghsoudlou, Y. and Kashaninezhad, M., 2009.** Effect of hydrocolloids on amount of oil uptake and quality attribute of potato French fries. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 16(3):123-135. (In Persian)
- Daraei Garmakhany, A., Mirzaei, H. O., Maghsudlo, Y., Kashani Nejad, M., and Jafari, M., 2014.** Production of low fat french-fries with single and multi-layer hydrocolloid coatings. *Journal of Food Science and Technology*. 51:1334-1341.
DOI:10.1007/s13197-012-0660-9
- Darocho, M., Ailén, A. and Carlos, P., 2018.** Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life *Food Hydrocolloids*, 81:351-363.DOI:10.1016/j.foodhyd.2018.03.017
- Das, A.K., Anjaneyulu, A.S.R., Gadekar, Y.P., Singh, R.P. and Pragati, H., 2008.**Effect of full-fat soy paste and textured soy granules on quality and shelf-life of goat meat nuggets in frozen storage. *Meat Science*, 80(3):607-14.
DOI:10.1016/j.meatsci.2008.02.011
- Freitas, D., Berbari, S., Prati, P., Fakhouri, F., Queiroz, F. and Vicente, E., 2009.** Reducing of fat uptake in cassava product during deep-fat frying. *Journal of Food Engineering*, 94:390–394.
DOI:10.1016/j.jfoodeng.2009.04.005
- He, R., Alashi, A., Malomo, S. A., Girgih, A. T., Chao, D., Ju, X. and Aluko, R.E., 2013.** Purification and hypotensive activity of rapeseed protein-derived renin and

- angiotensin converting enzyme inhibitory peptides Published in *Journal of Functional Foods*, 5(2):781–789. DOI:10.1016/j.jff.2013.01.024
- Hedayatifard, M. and Miri, M., 2017.** Changes of lipid oxidation indices and fatty acids composition of salted fillet of grass-carp *Ctenopharyngodon idella* affected by methods of cooking. *Iranian Fisheries Scientific Journal*, 26(4):57-72. DOI:10.22092/ISFJ.2017.113923
- Karazhiyan, H., Razavi, S.M.A., Phillips, G.O., Fang, Y., Al-Assaf, S., Nishinari, K. and Farhoosh, R., 2009.** Rheological properties of *Lepidium sativum* seed extract as a function of concentration, temperature and time. *Food Hydrocolloids*, 23:2062-2068. DOI:10.1016/j.foodhyd.2009.03.019
- Karazhiyan, H., Razavi, S.M.A. and Phillips, G.O., 2011.** Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloids*, 25:915-920. DOI:10.1016/j.foodhyd.2010.08.022
- Mahdavi, V., Hosseini, E. and Sharifian, A., 2018.** Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. *Food Science and Nutrition*, 6(2):269- 279. DOI:10.1002/fsn3.544
- Marineli, R.S., Moraes, É.A., Lenquiste, S.A., Godoy, A.T. Eberlin, M.N. and Maróstica, M.R., 2014.** Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *Food science and Technology*, 59(2):1304–1310. DOI:10.1016/j.lwt.2014.04.014
- Mazloomi-Kiyapey, N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E. and Nourmohammadi, E., 2019.** Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *Arya Atherosclerosis*, 15(5):218-227. DOI:10.22122/arya.v15i5.1755
- Mohan, K.B.L. and Babu, R., 2012.** Effect of frying conditions on quality of fried onion slices. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 44(5):483-486. (In Persian)
- Mokhtariyan, M., Tavakolipour, H. and Kalbasi-Ashtari, A., 2014.** Intelligent monitoring of zucchini drying process based on fuzzy expert engine and ANN. *Journal of Food Process*, 37(5):474-481 DOI:10.1111/jfpe.12101
- Nemati, M., Javadian, S.R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M., 2019.** A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*, 18(7):950-956. DOI:10.5829/idosi.wasj.2012.18.07.1092
- Ojagh, M., Shabanpour, B., Jamshidi, A. and Siyamiyan, A., 2018.** Study on the changes of approximate composition and physical parameters of nugget of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during the initial frying in several vegetable oils at different temperature levels. *Iranian*

- Scientific Fisheries Journal*, 14(2):229-241.
DOI:10.22067/ifstrj.v0i0.60213
- Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B., 2012.** Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2):460-465.
DOI:10.1007/s11947-009-0284-x
- Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M., 2013.** Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7):1718–1726.
DOI:10.1002/jsfa.5957
- Ronald, S.K. and Ronald, S., 1991.** Pearson's chemical analysis of food. 9th Edn. Longman Scientific Technical, Wiley, New York, USA. 708 P.
- Sanez, T., Salvador, A. and Fiszman, S.M., 2008.** Innovative method for preparing a frozen, battered food without a prefrying step. *Journal of Food Hydrocolloids*, 18:227-231. DOI:10.1016/S0268-005X(03)00067-5
- Sheykhnezhad, A., lababpour, A. and Moazami, N., 2017.** Increasing cyanobacteria *Spirulina* production with mixing and chemical composition of culture medium. *Iranian Journal of Biology*, 28(2):344-353.
DOI: 20.1001.1.23832592.1394.28.2.12.9
- Villanueva-Lazo, A., Montserrat-de la Paz, S., Grao-Cruces, E., Pedroche, J., Toscano, R., Millan, F. and Millan-Linares, M.C., 2022.** Antioxidant and immunomodulatory properties of Chia protein hydrolysates in primary human monocyte-macrophage plasticity. *Foods*, 11(5):623.
DOI:10.3390/foods11050623
- Yu, N., Hu, P., Xu, S., Chen, M., Wang, S., Hong, J. and Cai, T., 2020.** Strain engineering and epitaxial stabilization of halide perovskites. *National Library of Medicine*, 577(7789):209-215.
DOI:10.1038/s41586-019-1868-x
- Zhou, H.M. and Qian, H., 2006.** Antioxidant and free radical scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41:1296–1302.
DOI:10.1016/j.procbio.2005.12.029