

استخراج ژلاتین به کمک آبکافت آنزیمی از پوست فیل ماهی (*Huso huso*) به روش بهینه یابی سطح پاسخ (RSM)

زهرا اسکندری^۱، سید علی جعفرپور^{۱*}، علی معتمدزادگان^۲

*a.jafarpour@sanru.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- گروه صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

چکیده

ژلاتین ماهی خصوصاً با داشتن خصوصیتی مانند دمای ذوب پایین تر، حل شدن سریع در دهان و عدم ایجاد حالت الاستیکی یکی از مناسب ترین جایگزین های ژلاتین پستانداران محسوب شده و به عنوان غذایی حلال پذیرفته می باشد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر سه فاکتور دما در سه سطح ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی گراد، آنزیم در سه سطح ۰/۰۱٪، ۰/۰۵۵٪ و ۰/۱٪ وزنی-وزنی و pH در سه سطح ۲، ۳ و ۴ بر روی استخراج ژلاتین از پوست فیل ماهی بود. در این راستا پارامترهای استحکام ژل در قالب نقطه شکست و عمق نفوذ، بازده ژلاتین و پارامترهای رنگ (L^* ، a^* و b^*) پودرهای ژلاتین استخراج شده و میزان سفیدی آن اندازه گیری شد. بر اساس نتایج بیشترین بازده ژلاتین تولیدی در فرآیند آنزیمی با میزان ۲۱/۶۵٪ مربوط به تیمار با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم ۰/۰۱٪ و pH=۲ بود درحالی که این عدد در فرآیند شیمیایی ۱۰٪ به دست آمد. از سوی دیگر، با افزایش pH و درصد آنزیم، استحکام ژل افزایش یافت ($p<0/05$). اما دما اثر معنی داری بر آن نداشت ($p<0/05$). بررسی رنگ ژلاتین نشان داد که میزان روشنایی (L^*)، قرمزی (a^*) و سفیدی (b^*) در پودر ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی بیشتر از روش شیمیایی بوده ($p<0/05$). بیشترین روشنایی در ژلاتینی که با شرایط دمایی ۴۰ درجه سانتی گراد، درصد آنزیم ۰/۰۵۵٪ وزنی-وزنی و pH=۳ مشاهده شد. بر اساس نتایج بیشترین بازده ژلاتین تولید شده در فرآیند آنزیمی با میزان ۲۱/۶۵٪ مربوط به تیمار با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم ۰/۰۱٪ و pH=۲ بود درحالی که این عدد در فرآیند شیمیایی ۱۰٪ به دست آمد. نتیجه اینکه استفاده از دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و درصد آنزیم ۰/۱٪ وزنی-وزنی و pH=۴ منجر به استحکام ژل بیشتر ولی استفاده از دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم ۰/۰۱٪ و pH=۲ منجر به تولید ژلاتین با بازده بیشتر می شود.

کلمات کلیدی: استحکام ژل، استخراج آنزیمی، بازده، رنگ، ژلاتین، فیل ماهی

*نویسنده مسئول

مقدمه

ژلاتین یک ترکیب پروتئینی قابل حل در آب است که توسط هیدرولیز جزئی از کلاژن بدست می آید و پروتئین رشته ای اصلی در استخوان ها، غضروف و پوست را تشکیل می دهد، در واقع منبع، سن حیوان و نوع کلاژن عوامل مؤثر بر خواص ژلاتین می باشند (Bailey et al., 1998). ژلاتین به طور گسترده در بسیاری از زمینه های صنعتی قابل استفاده است از جمله غذا، دارو، عکاسی (Rahman et al., 2008) و به دلیل خواص بی نظیر شیمیایی و فیزیکی کاربرد گسترده تری در صنایع غذایی و دارویی دارد (Yang et al., 2007). با استفاده از پوشش ژلاتین حاوی اسانس دارچین می توان از رشد باکتری ها در فیلدهای تازه ماهی جلوگیری نمود و ویژگی های حسی آن شامل: بافت، بو، رنگ و پذیرش کلی را نیز تا حدود زیادی حفظ کرد و موجب افزایش دوره نگهداری ماهی در یخچال شد (تقی زاده اندواری و رضایی، ۱۳۹۱). ژلاتین دام به اشکال مختلف و در ابعاد وسیع مصرف جهانی دارد، اما بدبینی و هشدارهای جدی برای مصرف ژلاتین دام وجود دارد (Asher, 1999). این امر اغلب به دلیل عقاید مذهبی در ادیان اسلام و یهود، شیوع بیماری های مغزی اسفنجی ژلاتین پستانداران و نیز شیوه های خاص زندگی مانند گیاهخواری است (Karim & Bhat, 2009). ژلاتین ماهی با داشتن خصوصیتی مانند دمای ذوب پایین تر، حل شدن سریع در دهان و عدم ایجاد حالت لاستیکی یکی از مناسب ترین جایگزین های ژلاتین پستانداران محسوب شده و به عنوان غذایی حلال پذیرفته می باشد. از لحاظ تجاری ژلاتین ماهی به دلیل دمای تشکیل ژل و ذوب پایین با ژلاتین پستانداران قابل رقابت نیست. برای برطرف کردن یا کاهش برخی از این مشکلات راهکارهایی مانند استفاده از آنزیم برای استخراج، ارائه شده است که یکی از آنها بهبود استحکام و خصوصیات ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی است (Tong & Ying, 2013). آنزیم پپسین حیوانی که به نام EC ۳.۴.۲۳.۲ نیز شناخته می شود، یک پروتئاز اسیدی مهم است که به طور گسترده ای در هیدرولیز پروتئین ها استفاده می شود و جزء پروتئازهای آسپارتیک مهم با

بسیاری از ویژگی های منحصر بفرد در برنامه های کاربردی صنعتی و نیز در تحقیقات پزشکی استفاده می شود (Zhao et al., 2011). بهینه سازی استخراج و خصوصیات کلاژن تهیه شده از پوست ماهی خاویار چینی (*Acipenser sturio*) (Linnaeus) به کمک آنزیم توسط (Feng et al., 2013)، بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که الگوهای ژل الکتروفورز دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) نشان داد که پوست ماهی خاویار حاوی کلاژن نوع I است که از زنجیره α و زنجیره β ساخته شده است. طیف مادون قرمز کلاژن همچنین نشان داد که هیدرولیز پپسین بر ساختار ثانویه کلاژن بویژه ساختار سه بعدی، تأثیر نمی گذارد.

فیل ماهی جزء ماهیان خاویاری و از خانواده تاس ماهیان و از بزرگترین ماهیان آب شیرین است که در دریای خزر، سیاه و آزوف پراکنش طبیعی دارد. نسل این ماهی نیز همانند بسیاری از گونه های خاویاری به دلایلی چند از جمله صید بی رویه و قاچاق، تخریب مناطق تخم ریزی و آلودگی های زیست محیطی بشدت کاهش یافته، با این حال تلاش هایی برای حفظ ذخایر آن در تفریحگاه ها در حال انجام است (فلاحکار و شاهواری، ۲۰۰۹). بنابراین، پرورش ماهیان خاویاری جهت تولید گوشت و خاویار و همچنین به دلیل اهمیت آن در کاهش فشار به ذخایر طبیعی مورد توجه می باشد و توسعه یافته است (Pourkazemi, 1997). در این تحقیق از فیل ماهی استفاده شد. هدف از این مطالعه استخراج ژلاتین از پوست فیل ماهی خاویاری به کمک آنزیم پپسین و سپس بررسی اثر آنزیم بر بهبود خواص بافتی ژلاتین و ویژگی های عملکردی آن نسبت به ژلاتین استخراج شده به روش شیمیایی می باشد.

مواد و روش کار

تهیه پوست و آماده سازی نمونه

آماده سازی پوست به روش (Feng et al., 2013) انجام شد. پوست فیل ماهی خاویاری (*Huso huso*) پرورشی با همکاری اداره شیلات استان مازندران از استخر پرورش

ماهيان خاوياري واقع در شهرستان بابلسر بخش بهنمير روستاي ميرود در شهريور ماه ۱۳۹۶ تهيه گرديد و در يونوليت حاوي يخ به محل آزمايشگاه پيلوت فراوري محصولات شبيلاتی دانشگاه منابع طبيعي و علوم کشاورزي ساري انتقال داده شد.

فرآيند پيش فراوري پوست فيل ماهي خاوياري

پيش تيمار سازي پوست به روش (Feng et al., 2013) با اندکي تغيير در مراحل پيش تيمارسازي انجام گرديد. محلول ۳/۵٪ نمک طعام (NaCl)، جهت حذف پروتئين هاي غيرکلزني، و محلول ۵٪ سدیم کربنات (Na₂CO₃)، جهت حذف چربي از پوست استفاده گرديد. پيش فراوري اوليه با محلول ۳/۵٪ سدیم کلريد به نسبت ۱:۱۰ وزني-حجمي با سرعت ۱۸۰ دور در دقيقه به مدت ۶ ساعت به صورت مداوم هم زده شد و هر ۳ ساعت محلول تعويض شد. پس از شست و شو پوست ها با آب مقطر با نسبت ۱:۱۰ وزني-حجمي با محلول ۵٪ سدیم کربنات با سرعت ۱۸۰ دور در دقيقه به مدت ۶ ساعت به صورت مداوم هم زده شد و هر ۳ ساعت محلول عوض شد. سپس با آب مقطر شسته و فرآيند استخراج انجام شد.

ماهيان خاوياري واقع در شهرستان بابلسر بخش بهنمير روستاي ميرود در شهريور ماه ۱۳۹۶ تهيه گرديد و در يونوليت حاوي يخ به محل آزمايشگاه پيلوت فراوري محصولات شبيلاتی دانشگاه منابع طبيعي و علوم کشاورزي ساري انتقال داده شد.

فرآيند پيش فراوري پوست فيل ماهي خاوياري

پيش تيمار سازي پوست به روش (Feng et al., 2013) با اندکي تغيير در مراحل پيش تيمارسازي انجام گرديد. محلول ۳/۵٪ نمک طعام (NaCl)، جهت حذف پروتئين هاي غيرکلزني، و محلول ۵٪ سدیم کربنات (Na₂CO₃)، جهت حذف چربي از پوست استفاده گرديد. پيش فراوري اوليه با محلول ۳/۵٪ سدیم کلريد به نسبت ۱:۱۰ وزني-حجمي با سرعت ۱۸۰ دور در دقيقه به مدت ۶ ساعت به صورت مداوم هم زده شد و هر ۳ ساعت محلول تعويض شد. پس از شست و شو پوست ها با آب مقطر با نسبت ۱:۱۰ وزني-حجمي با محلول ۵٪ سدیم کربنات با سرعت ۱۸۰ دور در دقيقه به مدت ۶ ساعت به صورت مداوم هم زده شد و هر ۳ ساعت محلول عوض شد. سپس با آب مقطر شسته و فرآيند استخراج انجام شد.

استخراج ژلاتين از پوست: استخراج به روش (Tong & Ying, 2013) با اندکي تغيير در مراحل استخراج انجام شد. ژلاتين از پوست پيش تيمار يافته در آب مقطر به نسبت (۱:۲/۸) وزني-حجمي در دماهاي (۳۰، ۴۰ و ۵۰) درجه سانتی گراد و درصد آنزيم (۰/۱، ۰/۰۵۵ و ۰/۱) وزني-وزني و pH (۲، ۳ و ۴) به مدت ۶ ساعت و ۴۵ دقيقه در بن ماري (Fan azma gostar, Iran) انجام شد به منظور تنظيم pH مناسب جهت فعاليت آنزيم در طول مدت استخراج هر ۳۰ دقيقه یکبار pH توسط pH متر (pH meter, CB 16 NW, U.K) اندازه گيري شد و برای رساندن آن به مقدار موردنظر از هيدروکلريك اسيد و سدیم هيدروکسید ۱ نرمال استفاده شد. پس از پايان استخراج مخلوط در حمام آب جوش به مدت ۵ دقيقه برای غيرفعال کردن آنزيم ها قرار گرفت و در مرحله بعد محلول از پارچه تنظيم عبور يافته و سپس در سانترفیوژ

تعيين استحکام ژل

استحکام ژل به روش (Mohtar et al., 2013) با اندکي تغيير با استفاده از دستگاه بافت سنج تعيين شد. برای اندازه گيري استحکام ژل ابتدا محلول ژلاتين ۳٪ وزني-حجمي تهيه شد. سپس نمونه هاي محلول ژلاتين ۳٪ در ظرف هاي پلاستيکي با قطر ۵/۵ و ارتفاع ۳ سانتيمتر ريخته شد نمونه ها به منظور طول دوره قوام ژل، به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداري گرديدند. بلوم نمونه هاي ژل در شرايط دستگاهي، با پيستون استوانه اي با قطر ۱/۲۷ سانتی متر، بار سل ۱۰ كيلو نيوتون، سرعت نفوذ ۱ ميلي متر بر ثانيه و عمق نفوذ ۱۰ ميلي متر در ژل، اندازه گيري و ثبت شد و عدد بلوم از طريق معادله ذيل محاسبه شد.

$$\text{Gel Strength (g)} = \text{Load (g)} \times \text{Distance (mm)}$$

بازده ژلاتين

مقدار بازده ژلاتين استخراج شده مطابق روش (Alfaro et al., 2009) از طريق معادله ذيل محاسبه گرديد:

$$\text{بازده} = \frac{\text{وزن ژلاتين خشک شده}}{\text{وزن پوست اوليه}} \times 100$$

تعیین رنگ

اندازه‌گیری رنگ به روش (Chanarat & Benjakul, 2012) با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج مدل (IMG-Pardazesh Cam-Systeme XI) با منبع نوری ۴۵ درجه و ناظر صفر درجه رنگ سنجی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش به منظور بهینه‌سازی تیمارهای آزمایشی از طرح آماری روش سطح پاسخ (Response surface methodology (RSM) استفاده می‌شود. به منظور بهینه‌سازی فرآیند استخراج آنزیمی ژلاتین از طرح مرکب مرکزی (Central composite rotatable design) استفاده خواهد شد. بهینه‌سازی بر اساس قدرت ژل به عنوان شاخص در نظر گرفته شد. اثر متغیرهای مستقل شامل دما (۳۰، ۴۰ و ۵۰) درجه سانتیگراد، درصد آنزیم (۰/۱، ۰/۰۵۵ و ۰/۱) وزنی-وزنی و pH (۲، ۳ و ۴) در سه سطح مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). آزمون آماری مدل بدست‌آمده برای هر پاسخ بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA صورت گرفت. جهت طراحی آزمایش، آنالیز نتایج، رسم نمودارها و بهینه‌سازی از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت (نسخه ۷) (Design Expert 7.00) استفاده شد.

جدول ۱: سطوح متغیرهای آزمایشی جهت استخراج ژلاتین از پوست فیل ماهی

Table 1: Experimental variables levels for gelatin extraction from *Huso huso* skin.

نوع متغیر	نماد	سطوح کدبندی شده		
		-۱	۰	+۱
دما (°C)	A	۳۰	۴۰	۵۰
نسبت آنزیم (w/w)	B	۰/۰۱	۰/۰۵۵	۰/۱
pH	C	۲	۳	۴

نتایج

اندازه‌گیری استحکام ژل

نتایج اندازه‌گیری استحکام ژل در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس (جدول ۳) پاسخ استحکام ژل ژلاتین استخراج شده نشان دادند. تغییرات pH بیشترین تأثیر را بر میزان استحکام ژل ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی داشته است ($p < 0.01$). نمودار سه بعدی در شکل ۱ اثر نسبت آنزیم و pH را بر میزان استحکام ژل ژلاتین استخراج شده نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان بازده

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان بازدهی پودر ژلاتین استخراج شده در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس (جدول ۳) پاسخ میزان بازده را نشان می‌دهد. نمودار سه‌بعدی سطح پاسخ برای داده‌های حاصل از نتایج آنالیز واریانس بازدهی پودر ژلاتین استخراج شده در شکل ۲ به نمایش گذاشته شده است.

اندازه‌گیری رنگ پودر ژلاتین استخراج شده

نتایج اندازه‌گیری رنگ پودر ژلاتین استخراج شده در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس (جدول ۳) پاسخ میزان سفیدی پودر ژلاتین استخراج شده را نشان می‌دهد. نمودار سه‌بعدی در شکل ۳ اثر نسبت آنزیم و pH را بر میزان سفیدی پودر ژلاتین استخراج شده نشان داده است.

با توجه به اطلاعات موجود در جدول (۴) مدل‌های بدست آمده و برازش داده شده در تمامی سطح پاسخ‌های مورد بررسی در آزمایش (متغیرهای وابسته)، صحت مدل از ضریب تبیین (R^2) و ضریب تبیین اصلاح شده بالا برخوردار بود (جدول ۴).

جدول ۲: نتایج اندازه‌گیری میزان استحکام ژل و میزان بازدهی ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی از پوست فیل ماهی در طرح سطح پاسخ بهینه

Table 2: The firmness and yield data related to the extracted gelatin from *Huso huso* skin by enzymatic method in RSM design.

تیمار	دما (°C)	نسبت آنزیم (%)	pH	استحکام ژل (g)	بازده (%)
۱	۴۰	۰/۱	۳	۱۰۷۹/۷	۱۷/۶۵±۱
۲	۳۰	۰/۰۱	۲	۹۴۹/۲	۱۹/۴۲±۱
۳	۵۰	۰/۱	۴	۱۳۱۶/۴۸	۱۴/۸±۱
۴	۵۰	۰/۰۵۵	۳	۹۶۳/۲۷	۱۸/۰۲۵±۱
۵	۳۰	۰/۱	۴	۲۴۶۶/۳۶	۷/۴۵±
۶	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۵۰۳/۹	۱۸/۱۲±۱
۷	۵۰	۰/۰۱	۴	۱۰۱۱/۹	۱۶/۶۲±۱
۸	۳۰	۰/۰۱	۴	۱۰۵۱/۰۵	۱۰/۰۵±۱
۹	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۹۹۳/۵۵	۱۸/۰۱۲±۱
۱۰	۴۰	۰/۰۵۵	۲	۸۹۹/۶	۱۶/۲۵±۱
۱۱	۳۰	۰/۱	۲	۹۴۱/۴۲	۱۷/۵۵±۱
۱۲	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۸۸۹/۳	۱۸/۹±۱
۱۳	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۸۲۸/۶	۱۷/۸۷±۱
۱۴	۵۰	۰/۱	۲	۷۹۹/۹	۲۰/۴۲±۱
۱۵	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۹۱۶/۸	۱۶/۵۷±۱
۱۶	۳۰	۰/۰۵۵	۳	۹۱۳/۲۵	۱۲/۵۵±۱
۱۷	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۹۰۹/۹۲	۱۸/۱۵±۱
۱۸	۴۰	۰/۰۵۵	۴	۲۰۸۷/۷	۱۲/۸±۱
۱۹	۵۰	۰/۰۱	۲	۴۸۳/۰۸	۲۱/۶۵±۱
۲۰	۴۰	۰/۰۱	۳	۶۷۹/۴۵	۱۸/۷۲±۱
شیمیایی	۷۵	۰	۰	۱۱۲۴/۷۶	۱۰±۱

جدول ۳: آنالیز واریانس نتایج استحکام ژل، بازده و سفیدی پودر ژلاتین استخراج شده از پوست فیل ماهی به روش آنزیمی

Table 3: The ANOVA results of gelatin gel strength, yield and powder whiteness in respond surface method extracted from Beluga *H. huso* skin by enzymatic method

مدل‌ها	استحکام ژل	بازده	سفیدی
منبع	مجموع مربعات	سطح احتمال	مجموع مربعات
سطح احتمال	مجموع مربعات	سطح احتمال	مجموع مربعات
مدل	۰۰۰۶E۳/۴۳۰	۰/۰۰۸۲	۲۱۴/۵۶
A	۰۰۰۵E۳/۰۵۱	۰/۰۶۸۱	۶۰/۰۲
B	۰۰۰۵E۵/۹۱۵	۰/۰۱۷۳	۷/۴۰
C	۰۰۰۶E۱/۴۹۰	۰/۰۰۱۱	۱۱۲/۷۳
AB	۷۷۲۵۰/۰۵	۰/۷۷۳۲	۰/۲۵
AC	۴۲۲۵۱/۷۹	۰/۴۶۴۲	۹/۷۴
BC	۰۰۰۵E۲/۴۸۸	۰/۰۹۴۵	۰/۲۲
A ²	۱۹۶۷۶/۲۷	۰/۶۱۴۸	۴/۲۴
B ²	۵۷۶۳۷/۲۸	۰/۳۹۴۹	۷/۵۶
C ²	۰۰۰۵E۶/۰۹۶	۰/۰۱۶۱	۱۱/۰۵
باقیمانده	۰۰۰۵E۷/۲۹۵	-	۱۶/۵۵
عدم برازش	۰۰۰۵E۵/۷۹۶	۰/۰۸۲۰	۱۳/۶۸
خطای خالص	۰۰۰۵E۱/۴۹۹	-	۲/۸۷
مجموع مربعات کل	۰۰۰۶E۴/۱۵۹	-	۲۳۱/۱۱

جدول ۴: مدل های برازش داده شده برای پارامترهای مورد اندازه گیری پودر ژلاتین استخراج شده

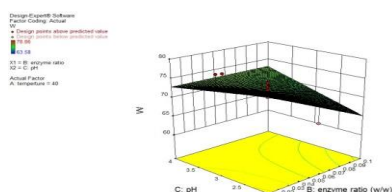
Title 4: Fitted models related to measured parameters of the extracted gelatin powder from *H. huso* skin

ردیف	متغیر اندازه گیری شده	مدل بدست آمده	R^2	-adj R^2
۱	استحکام ژل	$Y = 1.0246/11B - 2363/64C + 47.0/AC^2$	۰/۸۲۴۶	۰/۶۷۶۶
۲	بازده	$Y = -3/24611 + 0/88620A + 4/46175C + 0/11031AC - 2/00489C^2$	۰/۹۲۸۴	۰/۸۶۳۹
۳	سفیدی	$Y = -244/98889B + 63/72222BC$	۰/۶۵۱۲	۰/۴۹۰۲

جدول ۵: نتایج حاصل از اندازه گیری رنگ پودر ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی از پوست فیل ماهی

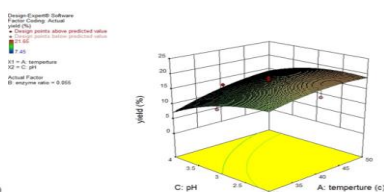
Table 5: The color data of gelatin powder extracted by enzymatic method from *H. huso* skin

تیمار	دما (°C)	نسبت آنزیم (%)	pH	L	a*	b*	W
۱	۴۰	۰/۱	۳	۶۷/۹۷±۳/۳۹	-۰/۱۲±۲/۶۵	۲/۴±۲/۸۹	۶۸/۶۸±۳/۴۳
۲	۳۰	۰/۰۱	۲	۷۷/۲۹±۲/۸۶	-۰/۷۶±۱/۰۶	۱/۸۹±۱/۶۷	۷۷/۱۳±۲/۸۶
۳	۵۰	۰/۱	۴	۷۱/۲۴±۴/۲۷	-۰/۰۹±۲/۰۴	۱/۳۶±۲/۵۹	۷۱/۰۳±۴/۳۵
۴	۵۰	۰/۰۵۵	۳	۷۳/۴۲±۱/۰۸	-۱/۹۸±۱/۱۹	۴/۸۷±۲/۱۶	۷۲/۸۱±۱/۳۶
۵	۳۰	۰/۱	۴	۷۵/۰۵±۲/۳۳	-۲/۵۲±۱/۵۷	۵/۹۷±۲/۲۹	۷۴/۱۳±۲/۷۱
۶	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۹/۳۹±۱/۰۴	-۰/۶۱±۰/۵۷	۱/۰۳±۱/۰۲	۷۹/۳۶±۱/۰۳
۷	۵۰	۰/۰۱	۴	۷۶/۶۵±۴/۰۹	۰/۴۲±۲/۱۹	۱/۵۳±۱/۵۵	۷۳/۵۴±۱/۱۴
۸	۳۰	۰/۰۱	۴	۶۹/۱۶±۲/۴	.	.	۶۹/۱۶±۲/۴
۹	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۷/۸۷±۱/۱۳	-۲/۱۲±۱/۵۸	۵/۵۲±۲/۱۴	۷۷/۴۶±۱/۳۲
۱۰	۴۰	۰/۰۵۵	۲	۶۸/۵۲±۲/۶۴	-۱/۳۸±۱/۳۵	۹/۶۰±۴/۷۷	۶۶/۷۵±۲/۶۹
۱۱	۳۰	۰/۱	۲	۶۴/۸۴±۳/۷	-۱/۸۹±۲/۴۴	۸/۸۳±۱/۷۱	۶۳/۵۸±۳/۳۵
۱۲	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۷/۴۵±۱/۱۷	-۱/۳۶±۱/۰۷	۳/۲۷±۱/۵۸	۷۷/۰۲±۱/۳۵
۱۳	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۹/۸۱±۱/۰۱	.	.	۷۹/۸۱±۱/۰۱
۱۴	۵۰	۰/۱	۲	۷۱/۷۸±۲/۰۴	-۵/۹۹±۰/۴۴	۱۲/۷۲±۱/۳۹	۶۸/۴۲±۱/۶۵
۱۵	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۸/۹۸±۱/۰۸	-۰/۶۱±۰/۵۷	۱/۰۳±۱/۰۲	۷۸/۹۲±۱/۰۶
۱۶	۳۰	۰/۰۵۵	۳	۷۴/۲۴±۱	-۱/۰۹±۰/۷۷	۲/۱۴±۱/۷۸	۷۴/۰۷±۱/۱
۱۷	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۵/۹۳±۱/۲۶	-۲/۱۲±۱/۵۸	۵/۵۲±۲/۱۴	۷۵/۱۲±۱/۶۴
۱۸	۴۰	۰/۰۵۵	۴	۷۳/۷۱±۴/۴۹	-۱/۰۲±۱/۳۹	۱/۹۴±۲/۶۶	۷۳/۵۱±۴/۵۶
۱۹	۵۰	۰/۰۱	۲	۷۵/۸۱±۱/۲۴	-۱/۲۴±۱/۲۷	۴/۳۵±۱/۷۹	۷۵/۳۱±۱/۳۵
۲۰	۴۰	۰/۰۱	۳	۷۸/۸۶±۱/۲۴	.	.	۷۸/۸۶±۱/۲۴
شیمیایی	۷۵	.	.	۶۹/۴۷±۴/۴۱	-۵/۴۶±۲/۹۹	۱۴/۸۱±۳/۳۸	۶۵/۳۰±۳/۴۱



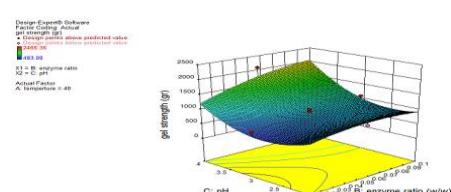
شکل ۳: نمودار سه بعدی اثر نسبت آنزیم و pH بر سفیدی رنگ پودر ژلاتین استخراج شده از پوست فیله ماهی

Figure 3: The 3D diagram of enzyme ratio and pH effects on the whiteness of extracted gelatin powder from *H. huso* skin.



شکل ۲: نمودار سه بعدی اثر دما و pH بر بازدهی ژلاتین استخراج شده از پوست فیله ماهی

Figure 2: The 3D diagram of enzyme ratio and pH effects on the yield of extracted gelatin from *H. huso* skin.



شکل ۱: نمودار سه بعدی اثر نسبت آنزیم و pH بر استحکام ژل ژلاتین استخراج شده از پوست فیله ماهی

Figure 1: The 3D diagram of enzyme ratio and pH effects on the gel strength of extracted gelatin from *H. huso*.

بحث

استحکام ژل

در روش استخراج آنزیمی بالاترین قدرت ژل ژلاتین (۲۴۶۶/۳۶ گرم) مربوط به ژلاتین استخراج شده با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و درصد آنزیم ۰/۱ و $\text{pH}=4$ بوده است. مشاهده شد که هرچقدر pH هیدرولیز افزایش یافته، قدرت ژل به دلیل فعالیت پایین آنزیم در این pH و در نتیجه هیدرولیز کمتر زنجیره های پلی پپتیدی توسط آنزیم، مناسب تر بوده است. این نتیجه با نتایج Damrongsakkul و همکاران (۲۰۰۸) که دریافتند با افزایش pH میزان اثر هیدرولیز آنزیم پاپائین بر روی زنجیره استخراجی کاهش می یابد و در نتیجه استحکام ژل بهبود می یابد، مطابقت داشت. استحکام این ژل به طور قابل توجهی از قدرت ژل استخراج شده به روش شیمیایی از پوست فیل ماهی (۱۱۲۴/۷۶ g) بیشتر بود. کمتر بودن قدرت ژل در روش شیمیایی احتمالاً به خاطر اثر تخریبی مواد شیمیایی بر زنجیره پروتئینی و کوتاه شدن زنجیره آن می باشد. این نتیجه با نتایج حاصله Nalinanon و همکاران (۲۰۰۷) که ژلاتین تهیه شده از پوست سرخو چشم درشت را با استفاده از آنزیم پیسین بررسی کردند، مطابقت داشت. با مراجعه به داده های حاصل از این پژوهش کمترین میزان استحکام ژل در این مطالعه مربوط به تیمار ۱۹ با دمای ۵۰ و نسبت آنزیم ۰/۱ و $\text{pH}=2$ می باشد. میزان استحکام ژل این تیمار در مقایسه با بهترین تیمار معادل (۰/۰۵) کمتر می باشد. که علت آن آبکافت و فعالیت زیاد آنزیم در این pH و به دنبال آن کوتاه شدن زنجیره های پلی پپتیدی پروتئین و در نتیجه استحکام پایین ژل می باشد. از سوی دیگر، با مراجعه به تیمار مرکزی (تیمار ۱۷) مشاهده گردید که استحکام ژل مربوط به این تیمار معادل ۹۰۹/۹۲ گرم می باشد که با مقایسه آن با بهترین تیمار و بدترین تیمار بترتیب دارای قدرت ژلی معادل (۰/۰۲۸) کمتر و (۰/۰۲) بیشتر می باشد. رسیدن به استحکام بالا را می توان به علت استفاده از آنزیم و عدم تخریب زنجیره های آلفا و نقش آنها در جلوگیری از تخریب اضافی پپتیدها دانست (Feng et al., 2013).

بازده

بیشترین میزان بازده ژلاتین تولیدی به روش آنزیمی از پوست فیل ماهی مربوط به تیمار با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و درصد آنزیم ۰/۱ وزنی-وزنی و $\text{pH}=2$ (۲۱/۶۵) بود و میزان آن در روش شیمیایی ۱۰٪ بود. در این مطالعه مشاهده شد که استفاده از کمترین میزان آنزیم (۰/۰۱) و بیشترین دما (۵۰ درجه سانتی گراد) برای استخراج ژلاتین بازده آن را نسبت به روش شیمیایی بیش از دو برابر افزایش داد. بنابراین به نظر می رسد در pH پایین و پایین ترین سطح آنزیم و بالاترین سطح دما که بالاترین بازدهی بدست آمده انتظار می رود در همین سطح pH با افزایش درصد آنزیم از ۰/۱ به ۰/۱ بتوان بازدهی بالاتری را به دست آورد اما در این مطالعه خلاف این امر مشاهده گردید که این بدان معناست که در $\text{pH}=2$ فعالیت آنزیم بسیار کاهش یافته است و عمده ترین فعالیت هیدرولیزی منحصرأ مربوط به عملکرد خود pH و دما می باشد نه آنزیم، زیرا در تیمار ۰/۱ آنزیم و $\text{pH}=2$ میزان بازدهی معادل ۱۷/۵۵ (تیمار ۱۱) که خود مؤید این امر می باشد. با مراجعه به داده های حاصل از این پژوهش کمترین میزان بازده ژلاتین استخراج شده مربوط به تیمار ۵ با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و درصد آنزیم ۰/۱ و $\text{pH}=4$ بوده است که با توجه به داده های بدست آمده میزان بازده در این تیمار در مقایسه با تیمار دارای بیشترین میزان بازده (تیمار ۱۹) معادل (۰/۰۳) کمتر می باشد. از سوی دیگر، با مراجعه به تیمار مرکزی (تیمار ۱۷) مشاهده شد که بازده ژلاتین استخراج شده مربوط به این تیمار معادل (۱۸/۱۵) می باشد که با مقایسه آن با تیمار دارای بیشترین میزان بازده (تیمار ۱۹) و تیمار دارای کمترین میزان بازده (تیمار ۵) بترتیب دارای بازدهی معادل (۰/۰۱۲) کمتر و (۰/۰۲) بیشتر می باشد. بازده پایین ژلاتین تهیه شده به روش شیمیایی ممکن است به علت حلالیت پایین پیوندهای عرضی شکل گرفته از طریق واکنش آلدهید با لیزین و هیدروکسی لیزین در قسمت های مارپیچی پپتید انتهایی باشد (Knott & Bailley, 1998). در مطالعه Matmaroh و همکاران (۲۰۱۱) که در رابطه با خواص کلاژن محلول

استخراج شده به کمک پپسین و اسید از فلس بز ماهی صورت گرفت، به این نتیجه رسیدند که میزان بازده کلاژن استخراج شده بر اساس وزن خشک به کمک پپسین (۰/۱۲) و در روش شیمیایی (۰/۴۶) یعنی حدود ۲/۶۱ برابر افزایش یافت. تفاوت در میزان بازده ممکن است به دلیل تفاوت در گونه ماهی، شرایط بیولوژیک و روش‌های آماده‌سازی مرتبط باشد (Regenstein & Zhou, 2007). نتایج نشان داد که پپسین در افزایش بازده ژلاتین استخراج شده از پوست فیل ماهی خاویاری مؤثر بوده است.

رنگ

رنگ ژلاتین به‌طور کلی وابسته به شرایط استخراج و مواد خام اولیه است. رنگ ژلاتین جزء خواص زیبایی‌شناسی آن است و به کاربرد آن وابسته است. در ضمن، رنگ اثری بر خواص عملکردی ژلاتین ندارد (Ockerman & Hansen, 1988). بیشترین مقدار شاخص L (تیمار ۱۳)، a^* (تیمار ۷) و b^* (تیمار ۱۴) و W (تیمار ۱۳) به ترتیب برای ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی ۷۹/۸۱، ۰/۴۲ و ۱۲/۷۲ و ۷۹/۸۱ و برای ژلاتین استخراج شده به روش شیمیایی ۶۹/۴۷، ۵/۴۶- و ۱۴/۸۲ و ۶۵/۳ بوده است. این نتایج نشان داد که روشنایی (L)، قرمزی (a^*) و سفیدی (W) ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی نسبت به روش شیمیایی بیشتر بود و میزان زردی (b^*) ژلاتین تهیه شده به روش آنزیمی نسبت به شیمیایی کمتر بود و دارای اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$). رنگ ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی از پوست سپر ماهی با ژلاتین گاوی استخراج شده به روش شیمیایی توسط Lassoued و همکاران (۲۰۱۴) بررسی گردید و دریافتند که ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی دارای میزان روشنایی (L) بیشتری نسبت به ژلاتین تهیه شده به روش شیمیایی است.

نتیجه گیری

در روش استخراج آنزیمی بالاترین قدرت ژل ژلاتین مربوط به ژلاتین استخراج شده با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و درصد آنزیم ۰/۱ و pH=۴ بوده است.

مشاهده شد که هر چه pH هیدرولیز افزایش یابد، قدرت ژل به دلیل فعالیت پایین آنزیم در این pH و در نتیجه هیدرولیز کمتر زنجیره‌های پلی‌پپتیدی توسط آنزیم، مناسب‌تر بوده است. در pH پایین و پایین‌ترین سطح آنزیم و بالاترین سطح دما بالاترین بازدهی بدست آمد. میزان بازده ژلاتین تهیه شده به روش شیمیایی نسبت به روش آنزیمی احتمالاً به علت حلالیت پایین پیوندهای عرضی شکل‌گرفته از طریق واکنش آلدهید با لیزین و هیدروکسی لیزین در قسمت‌های مارپیچی پپتید انتهایی پایین‌تر است و همچنین از نظر رنگ، پودر ژلاتین استخراج شده در روش آنزیمی دارای میزان روشنایی بیشتری است.

منابع

تقی زاده اندواری، ق. و رضایی، م. ۱۳۹۱. اثر پوشش ژلاتین همراه با اسانس دارچین بر دوره ماندگاری فیله ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دمای یخچال، مجله علمی شیلات / ایران، ۲۱ (۱): ۲۴-۱۳.

Asher, D.M., 1999. The transmissible spongiform encephalopathy agents: concerns and responses of United States regulatory agencies in maintaining the safety of biologics. *Developments in biological standardization*, 100:103-118

Bailey, A.J., Paul, R.G. and Knott, L., 1998. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of ageing and development*, 108:439-445. DOI: 10.1016/S0047-6374(98)00119-5.

Chanarat, S. and Benjakul, S., 2012. Comparative study on protein cross-linking and gel enhancing effect of microbial transglutaminase on surimi from different fish. *Journal of the Science of Food and*

- Agriculture, 92:844-852. DOI: 10.1002/jsfa.4656
- Da Trindade Alfaro, A., Simoes Dacosta, C., Graciano Fonseca, G. and Prentice, C., 2009.** Effect of Extraction Parameters on the Properties of Gelatin from King Weakfish (*Macrodon ancylodon*) Bones. *Journal of Food Science and Technology International*, 15:553-562. DOI: 10.1177/1082013209352921
- Damrongsakkul, S., Ratanathammapan, K., Komolpis, K., Tanthapanichakoon, W., 2008.** Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14:202-206. DOI: 10.1016/j.jiec.2007.09.010
- Feng, W., Zhao, T., Zhou, Y., Li, F., Zou, Y., Bai, S. and Wu, X., 2013.** Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of collagen from Chinese sturgeon (*Acipenser sturio Linnaeus*) skin. *Pharmacognosy magazine*, 9:S32-S37. DOI: 10.4103/0973-1296.117859
- Karim, A.A. and Bhat, R., 2009.** Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food hydrocolloids*, 23:563-576. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2008.07.002
- Knott, L. and Bailey, A.J., 1998.** Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Review Article*, 22:181-187. DOI: 10.1016/S8756-3282(97)00279-2
- Lassoued, I., Jridi, M., Nasri, R., Dammak, A., Hajji, M., Nasri, M. and Barkia, A., 2014.** Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 41:309-318. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.04.029
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B. and Kishimura, H., 2011.** Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food chemistry*, 129:1179-1186. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.099
- Mohtar, N.F., Perera, C.O., Quek, S.Y. and Hemar, Y., 2013.** Optimization of gelatine gel preparation from New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*) skins and the effect of transglutaminase enzyme on the gel properties. *Food hydrocolloids*, 31:204-209. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.10.011
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H., 2007.** Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104:593-601. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.12.035
- Ockerman, H.W. and Hansen, C.L., 1988.** Glue and gelatin animal by-product processing, New York, Ellis Horwood. pp133-157.
- Pourkazemi M., 1997.** The survey status of sturgeon fishes and their conservation in the

Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Science, 3:13-22.

Rahman, M.S., AL-SAIDI, G.S. and Guizani, N., 2008. Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. Food Chemistry, 108:472-481. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.079

Regenstein, J.M. and Zhou, P., 2007. Collagen and gelatin from marine by-product, Maximising the value of marine by-products, Elsevier, pp279-303.

Tong, Y. and Ying, T., 2013. Gelling strength improvement and characterization of a gelatin from scales of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). Journal of Food, Agriculture and Environment, 11:146-150.

Yang, H., Wang, Y., Jiang, M., Oh, J.H., Herring, J. and Zhou, P., 2007. 2-Step Optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*ictalurus punctatus*) skin gelatin. Food Science, pp72. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00319.x

Zhao, L., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, M.S. and Dave, D., 2011. Extraction, purification and characterization of fish pepsin: a critical review. Food Process Technol, 2:6-2. DOI: 10.4172/2157-7110.1000126

Enzymatic assisted extraction of gelatin from Beloga (*Huso huso*) fish skin in response surface method (RSM)

Eskandari Z.¹, Jafarpour S.A.^{1*}, Motamedzadegan A.²

*a.jafarpour@sanru.ac.ir

1. Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
2. Department of Food Science and technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Abstract

Fish gelatin, by benefiting the lower melting point, quicker mouth melting and presenting elastic characteristics is considered as the most proper substitute for mammals gelatin and as a Halal food item. The aim of this study was to evaluate the effects of temperature at three levels of 30, 40 and 50 °C, enzyme at 0.055%, 0.01% and 0.1% (w/w) levels and pH at 2, 3 and 4 levels on the quality of extracted gelatin from *Huso huso* fish skin. Accordingly, the gel strength in form of breaking force and distance, yield and color ($L^*a^*b^*$) and whiteness of resultant gelatin were determined. According to the results, the highest gelatin yields as 21.65% was related to the enzymatic assisted method at 50 °C, 0.01% enzyme at pH=2, whereas it was obtained as 10% at the chemical extraction method. Based on the results, despite from temperature, by increasing of pH and enzyme percentage, the firmness of gelatin was increased ($p<0.05$). The highest firmness was recorded at 30 °C, 0.1% enzyme at pH=4. The color data revealed that lightness (L^*), redness (a^*) and whiteness of enzymatic extracted gelatin powder was higher than the chemical extracted one ($p<0.05$). The highest lightness was observed at 40 °C, 0.055% enzyme at pH=3. In conclusion, by application of 30 °C and 0.1% enzyme at pH=4 the highest gelatin with the highest firmness is achievable, while using 50 °C and 0.01% enzyme at pH=2 could results the gelatin yield.

Keywords: Firmness, Enzymatic Extraction, Yield, Color, Gelatin, *Huso huso*

*Corresponding author