

بهینه سازی شرایط استخراج ژلاتین از فلس ماهی سفید

عباس مهجوریان^۱، محمد رضا سعیدی اصل^{۲*}، سارا جعفریان^۳، مریم طاها نژاد^۱،
بابک گل زاده^۴

۱- گروه مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سوادکوه، دانشگاه آزاد اسلامی، سوادکوه، ایران

۴- گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۲۴)

چکیده

ژلاتین به واسطه داشتن ویژگی‌های تکنولوژیکی و عملکردی مناسب، کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی دارد. فرآورده‌های جانبی حاصل از تمیز کردن ماهی، منبع غنی از کلاژن می‌باشند. ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و رئولوژیکی ژلاتین یا کلاژن به منبع و نیز شرایط استخراج آن بستگی دارد. روش سطح پاسخ با سه متغیر ورودی به منظور تعیین شرایط بهینه برای استخراج ژلاتین از فلس ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* به کار گرفته شد. طرح آماری باکس بنکن برای مطالعه اثرات غلظت هیدروکسید سدیم (۰/۲۲۵ - ۰/۰۷۵ مولار)، زمان غوطه‌وری در محلول هیدروکسید سدیم (۶۰-۱۸۰ دقیقه)، و دمای استخراج (۳۰-۵۰ درجه سانتی گراد) استفاده گردید. ویسکوزیته، قدرت ژلی، و شاخص روشنایی، قرمزی و زردی به عنوان پاسخ انتخاب شدند. نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای استخراج ژلاتین، غلظت هیدروکسید سدیم ۰/۱۱ مولار، زمان غوطه‌وری در یدروکسید سدیم ۱۱۶ دقیقه، و دمای استخراج ۳۸ درجه سانتی‌گراد بود. پاسخ‌های پیش‌بینی شده، شامل ویسکوزیته، قدرت ژلی، شاخص‌های روشنایی، قرمزی و زردی به ترتیب ۲/۱۷ میلی پاسکال بر ثانیه، ۱۴۵ گرم، ۶/۰۳، ۶/۸۰ و ۳۸/۵۸ بودند. روش سطح پاسخ توانست شرایط بهینه استخراج ژلاتین را با مطلوبیت بالا (۰/۹۹) تخمین بزند.

کلید واژگان: ژلاتین، فرآورده‌های جانبی، طرح آماری باکس بنکن، استحکام ژل، ویسکوزیته.

۱- مقدمه

ژلاتین به عنوان یکی از مهمترین بیوپلیمرهای زیستی، بواسطه داشتن ویژگی های فیزیکوشیمیایی و رئولوژیکی مطلوب، به طور گسترده ای در صنعت غذا از جمله در تولید ماست، دسر، شیرینی و نان مورد استفاده قرار می گیرد [۱،۲،۳]. در سال های اخیر، تقاضا برای ژلاتین و کلاژن در صنایع مختلف به طور قابل توجهی در حال افزایش است. بدلیل درصد بالای کلاژن در پوست خوک و گاو، اکثر تولیدکنندگان بزرگ دنیا از آن بعنوان ماده اولیه تولید ژلاتین استفاده می کنند، اما به دلایل مختلف فرهنگی-اجتماعی، منابع جایگزین به طور فزاینده ای مورد تقاضا می باشد [۴،۵]. ژلاتین استخراج شده از پوست و استخوان خوک برای اسلام و یهودیت قابل پذیرش نبوده، از طرفی دیگر، ژلاتین گاوی هم در مذهب هندو حرام است [۶]. همچنین به دلیل احتمال شیوع بیماری جنون گاوی^۱، انتقال این بیماری از طریق ژلاتین بدست آمده از بافت های حیوانات خشکی زی سوال برانگیز است. از این رو محققان به صورت پیوسته در حال تحقیق برای پیدا کردن منابع ژلاتین جایگزین هستند. این ترکیب، یکی از اجزای اصلی در ضایعات ماهی بوده که به مقدار زیادی در استخوان و فلس ماهی یافت می شود [۷]. در طول دو دهه ی گذشته، توجه به ژلاتین بدست آمده از ماهی و طیور رو به افزایش بوده، اما تولید تجاری از ژلاتین پوست و استخوان طیور به دلیل بازده پایین آن محدود است. در این زمینه ژلاتین ماهی به عنوان یک جایگزین بهتر برای ژلاتین های پستانداران از نقطه نظرهای اخلاقی و مذهبی مطرح می باشد. در حال حاضر، تولید ژلاتین ماهی خیلی رایج نیست و فقط حدود ۱٪ تولید سالیانه ی ژلاتین در جهان را تشکیل می دهد، اما با توجه به حجم عظیم صید ماهیانی که مصرف خوراکی ندارند (۲۱ درصد در مقابل ۷۹ درصد ماکول) و یا ضایعات انواع ماهیان خوراکی در حین فرآوری که دور ریز محسوب می شوند (پوست، فلس، استخوان و باله) باعث به ثمر رسیدن پژوهش هایی در زمینه استخراج این ماده ی ارزشمند از ضایعات ماهیان مختلف شده است، به طوری که باعث رشد آمار تولید ژلاتین از آبیان شده است [۲،۴،۵،۶،۷]. ژلاتین گونه های مختلف ماهی دارای ویژگی های

1. BSE

متنوعی نسبت به پستانداران می باشند. آنها دارای نقطه ذوب و دمای ژلاتینه پایین تری از ژلاتین پستانداران هستند [۲،۵]. با این حال، منابع برخی از ژلاتین های دریایی، ویسکوزیته بالاتری را نسبت به پستانداران نشان دادند [۸]. روش های استخراج ژلاتین به طور مستقیم بر خواص رئولوژیکی آن تأثیر می گذارند. به طور کلی، استفاده از روش های اسیدی، قلیایی، آنزیمی، فشار قوی و فراصوت برای استخراج کلاژن از منابع دریایی مختلف گزارش شده است [۵،۹،۱۰،۱۱]. در مطالعه انجام گرفته توسط علوی طلب و همکاران (۱۳۸۵) ژلاتین اسیدی و قلیایی پوست و باله ماهی فیتوفاگ با منابع دیگر مورد بررسی قرار گرفت. آنها بیان نمودند که ژلاتین قلیایی کپورنقره ای در مقایسه با ژلاتین اسیدی آن از کیفیت بهتری برخوردار بود. همچنین با مقایسه کیفیت ژلاتین فیتوفاگ با ژلاتین حاصل از منابع دیگر اعلام نمودند که کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی فیتوفاگ در مقایسه با کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی حاصل از منابعی مانند گاو، گوسفند، خوک، پای مرغ، پوست کوسه ماهی و غیره در برخی از موارد بهتر است [۱۲]. مهجوریان و همکاران (۲۰۱۳) خصوصیات رئولوژیکی ژلاتین استخراج شده از پوست فیل ماهی ایرانی را مورد بررسی قرار دادند. بالاترین و پایین ترین نقطه ذوب در نمونه های ژلاتینی به ترتیب مربوط به در تیمارهای اسید ۲/۰ نرمال - قلیا ۲ نرمال و اسید ۲ نرمال - قلیا ۲ نرمال بود. با کاهش غلظت ژلاتین و افزایش دما، ویسکوزیته کاهش یافت. درعین حال تأثیر غلظت اسید در مقابل غلظت قلیا در تغییرات ویسکوزیته بالاتر گزارش گردید [۵]. همچنین در پژوهشی دیگر، واگنوبی و نومهرم (۲۰۰۹) در بررسی استخراج ژلاتین از فلس سوسمار ماهی، بالاترین ویسکوزیته ۷/۵ سانتی پواز و قدرت ژل ۲۵۲ گرم را در نمونه بهینه گزارش کردند [۱۳]. ماهی سفید با نام علمی (*Rutilus frisii Kutum*) از خانواده ی کپور ماهیان *Cyprinidae* در دریای خزر بوده و در استان های گیلان و مازندران در ایران یافت می شود. تقریباً ۴-۳ درصد از وزن کل این ماهی را فلس تشکیل داده که معمولاً هنگام استفاده دور ریز می شود. این ضایعات به عنوان منبع خوبی از کلاژن بوده که می توان از آن در تولید ژلاتین استفاده نمود [۲]. روش سطح پاسخ مجموعه ای از تکنیک های آماری و ریاضی بوده که می توان با استفاده از آنها روابط موجود بین پاسخ و متغیرهای

محلول ۰/۴ مولار EDTA بمدت ۳۰ دقیقه انجام پذیرفت. در مرحله بعد، ابتدا فلس ها را به داخل بشر منتقل نموده و به نسبت ۱ به ۶ (وزنی/حجمی) به آن ها آب مقطر اضافه گردیده و تحت شرایط دمایی ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۲۰ دقیقه عملیات استخراج ژلاتین انجام شد. در انتها محلول ژلاتینی بدست آمده را ابتدا با عبور از پارچه توری و سپس از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ فیلتر نموده و در مرحله آخر با استفاده از آن تحت خلا در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد عملیات خشک کردن را تا زمانی که ورقه های ژلاتینی تشکیل گردد، ادامه یافت [۹]. پارامترهای ویسکوزیته، استحکام ژل، شاخص های روشنایی، قرمزی و نیز زردی به عنوان پاسخ برای تعیین تیمار بهینه انتخاب و با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت ۱۰ و آنالیز آماری گردیدند.

۲-۳- اندازه گیری ویسکوزیته

ویسکوزیته نمونه های ژلاتین به روش آرنسون و گیلدبرگ (۲۰۰۷) صورت پذیرفت. بدین منظور، ۲۰ میلی لیتر از محلول ژلاتین در غلظت ۳/۳۳٪ (وزنی/حجمی) در دمای ۴۰°C قرار گرفته و ویسکوزیته نمونه های مختلف با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد مجهز به اسپیندل S ۳۱ و سرعت چرخش ۱۰۰ rpm اندازه گیری شدند. نمونه ها قبل از اندازه گیری برای حل شدن کامل ژلاتین به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد نگه داشته شدند [۱۵].

۲-۴- اندازه گیری قدرت ژلی

نمونه های ژلاتین تا رسیدن به غلظت ۶/۶۷٪ (وزنی/پروتیین/حجمی) در آب مقطر ۶۰ درجه سانتی گراد حل شدند. محلول های مختلف تا زمان حل شدن کامل ژلاتین بهم زده شده و سپس به یک قوطی پلاستیکی با ۳ سانتی متر ارتفاع و ۲/۵ سانتی متر قطر منتقل گردیدند. نمونه ها قبل از انجام آزمون قدرت ژلی به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲±۰ درجه سانتی گراد به منظور طی دوران رسیدگی ژل قرار داده شدند. پس از طی مدت زمان مورد نظر، قدرت ژل نمونه ها در حالیکه همچنان در ظرف پلاستیکی قرار داشتند، بلافاصله پس از خروج از یخچال (حداکثر ۳۰ ثانیه) اندازه گیری گردیدند. این کار با استفاده از دستگاه بافت سنج و در شرایط دستگای زیر صورت گرفت: پیستون استوانه ای چدنی با قطر ۱۲/۷ میلی متر، سرعت نفوذ

مستقل را مشخص کرد. این روش تاثیر متغییر مستقل را به تنهایی، یا با هم بر روی فرایند ها تعریف می کند. علاوه بر این، به منظور تجزیه و تحلیل تاثیرات متغییر های مستقل با این روش شناسی تجربی، یک مدل ریاضی را در اختیار پژوهشگر قرار می دهد [۱۴]. هدف از پژوهش حاضر، بهینه سازی شرایط استخراج ژلاتین از فلس ماهی سفید به روش سطح پاسخ و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

فلس ماهی سفید تازه از بازار محلی در شهرستان محمود آباد جمع آوری گردید. فلس ها در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایشات نگهداری شدند. اسید استیک استفاده شده در این پژوهش ساخت شرکت مرک آلمان بود.

۲-۲- فرایند آماده سازی و استخراج ژلاتین از

فلس ماهی سفید

ابتدا فلس ماهی سفید از بازارهای محلی شهرستان محمود آباد تهیه، سپس با آب شستشو و با یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس فلس ها با آب فراوان کاملاً تمیز و در آبکش قرار گرفته تا آب از آن خارج شود. در نهایت فلس ها به بسته های پلاستیکی منتقل و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد در طول مدت آزمایشات نگهداری شدند. به منظور انجام عملیات دیفراست فلس ماهی سفید، از شب تا صبح در دمای ۷ درجه سانتی گراد در یخچال قرار گرفت. استخراج ژلاتین از روش لیسوفن و همکاران (۲۰۰۹) با کمی اصلاحات انجام پذیرفت. نمونه های فلس به نسبت ۱ به ۴ (وزنی/حجمی) در محلول هیدروکسید سدیم با غلظت های مختلف (۰/۲۲۵-۰/۰۷۵ مولار) و نیز در مدت زمان های ۶۰ تا ۱۸۰ دقیقه در دمای یخچال مورد تیمار قرار گرفتند. هیدروکسید سدیم، باعث تجزیه ترکیبات غیر کلاژنی و رنگدانه های روی فلس گردید. فرایند خنثی سازی با شستن فلس ها با آب فراوان^۲ تا زمانی ادامه پیدا نموده که به pH حدود ۸ برسد. عملیات معدنی زدایی با قرار دادن نمونه ها در

2. Top Water

در این پژوهش به منظور استخراج ژلاتین از فلس ماهی سفید از طرح باکس بنکن با سه متغیر مستقل شامل غلظت محلول هیدروکسید سدیم (۰/۲۲۵-۰/۰۷۵ مولار)، زمان غوطه وری در محلول هیدروکسید سدیم (۱۸۰-۶۰ دقیقه) و دمای استخراج (۵۰-۳۰ درجه سانتی گراد) از روش سطح پاسخ استفاده شد. تعیین ضرایب رگرسیونی، جداول آنالیز واریانس و رسم نمودارهای سطح پاسخ توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۰ انجام گردید. غلظت هیدروکسید سدیم (X_1)، زمان غوطه وری (X_2) و دمای استخراج (X_3) برای بهینه سازی متغیرهای مستقل استخراج انتخاب شدند (جدول ۱).

۱ mm/s و عمق نفوذ ۴ میلی متر. بیشترین مقدار نیرو (بر حسب گرم) لازم برای نفوذ پیستون به عمق ۴ میلی متر در ژل، ثبت و به عنوان قدرت ژل گزارش گردید [۷].

۲-۵- رنگ سنجی

برای اندازه گیری رنگ نمونه های مختلف از دستگاه هانتربل (Hunter Lab, Color Flex, USA) استفاده گردید. رنگ سنج، ابتدا با استفاده از صفحه سیاه و سفید کالیبره شده و در ادامه نمونه ها به داخل دستگاه منتقل و مورد آزمون قرار گرفتند. بر اساس بازتاب نور، شاخص های رنگی شامل L^* (روشنایی)، a^* (قرمزی) و b^* (زردی) اندازه گیری و یادداشت شدند [۱۶].

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

Table 1 The experimental range and levels of the variables

Variable	Range and levels			
	Symbol	Low (-1)	0	High (+1)
Sodium hydroxide concentration (M)	X1	0.075	0.150	0.225
Soaking time in sodium hydroxide solution (min)	X2	60	120	180
Extraction temperature (°C)	X3	30	40	50

مبنای طرح باکس بنکن با سه متغیر ورودی و ۱۷ تیمار با پنج تکرار در نقطه مرکزی و چهار تکرار در هر آزمون طراحی گردیدند (جدول ۲).

ویسکوزیته، قدرت ژلی و شاخص های رنگی به عنوان پاسخ (Y) های آزمایشات در نظر گرفته شدند. آزمون ها بر

Table 2 Experimental design of independent variables in the Box-Benken design for extraction of gelatin from Caspian whitefish scale

	Extraction temperature (°C)	Soaking time in sodium hydroxide solution (min)	Sodium hydroxide concentration (M)
1	30	60	0.15
2	30	120	0.225
3	40	120	0.15
4	40	120	0.15
5	40	60	0.075
6	40	60	0.225
7	50	120	0.225
8	50	60	0.15
9	40	180	0.075
10	50	120	0.075
11	40	120	0.15
12	50	180	0.15
13	40	120	0.15
14	40	120	0.15
15	30	180	0.15
16	30	120	0.075
17	40	180	0.225

۳- نتایج و بحث

با افزایش غلظت هیدروکسید سدیم از ۰/۰۷۵ به ۰/۲۲۵ مولار و افزایش زمان غوطه وری در محلول هیدروکسید سدیم از ۶۰ به ۱۸۰ دقیقه، در حالی که متغیر دیگر در نقطه مرکزی ثابت بوده، میزان ویسکوزیته ابتدا افزایش و در سطوح بالاتر کاهش یافت (شکل ۱a). اثر متغیرهای مستقل بر روی ویسکوزیته در سطح ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۳). ماکزیمم عدد پیش بینی شده برای ویسکوزیته (۲/۱۷ میلی پاسکال بر ثانیه) بوده که توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۰ تخمین زده شد. اثرات درجه دوم سه متغیر، تاثیر معنی داری را بر روی تغییرات ویسکوزیته در سطح ۵ درصد نشان دادند. ژلاتین با ویسکوزیته پایین، ژل های کوتاه شکننده و ژلاتین های با ویسکوزیته بالا، ژل های سخت انعطاف پذیر می دهند. ویسکوزیته محلول های ژلاتینی تحت تاثیر غلظت، دما، وزن مولکولی، pH، افزودنی ها و ناخالصی ها می باشد [۱۷]. در محلول های آبی در دمای بالای ۴۰ درجه سانتیگراد ژلاتین رفتار نیوتنی را نشان می دهد. ویسکوزیته محلول های ژلاتینی با افزایش غلظت ژلاتین و با کاهش دما افزایش می یابد [۱۸]. به طور کلی ژلاتین های با قدرت ژلی و ویسکوزیته بالا، ژلاتین های با کیفیت خوب محسوب می گردند [۱۳]. در بررسی بعمل آمده توسط علوی طلب و همکاران (۱۳۸۵) ویسکوزیته ژلاتین اسیدی و قلیایی فیتوفاگ به ترتیب ۴ و ۶ سانتی پواز بدست آمد [۱۲]. ویسکوزیته محلول های غلیظ ژلاتینی به طور عمده به برهمکنش های هیدرودینامیک بین مولکول ها ی آن بستگی دارد [۱۹]. اثر متقابل غلظت هیدروکسید سدیم و دمای استخراج در شکل ۱b نشان داده شده است. براین اساس، دما تاثیر محسوسی بر ویسکوزیته داشت، چنان که با افزایش دما، ویسکوزیته به صورت غیرخطی در محدوده تغییرات (۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد) افزایش و در سطوح بالاتر، این پارامتر کاهش یافت. با توجه به بالا بودن عدد F مشخص گردید که غلظت هیدروکسید سدیم نسبت به دو فاکتور دیگر بر تغییرات ویسکوزیته حساسیت بالاتری دارد. در سطوح بالاتر دما، بواسطه اینکه موجب تجزیه پلی پپتید های تولیدی شده و در زمان های بالاتر باعث کاهش ویسکوزیته از زمان ۱۵۰ تا ۱۸۰ دقیقه گردید. همچنین با افزایش غلظت

هیدروکسید سدیم، در ابتدا بدلیل بالا بودن میزان سوبسترا، سرعت تجزیه پروتیین افزایش و ترکیبات پروتیینی با وزن مولکولی بالا ایجاد می شود. همچنین در غلظت های بالاتر از ۰/۱۵ مولار، در شرایط کاهش غلظت سوبسترا و نیز تجزیه پلی پپتیدهایی با وزن مولکولی بالا، میزان ویسکوزیته کاهش پیدا نمود. اثر متقابل دمای استخراج و زمان غوطه وری بر ویسکوزیته ژلاتین فلس ماهی سفید در شکل ۱c نشان داده شده است. با افزایش دمای استخراج از ۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد، بالاترین ویسکوزیته و بعد از آن از روند کاهشی پیدا نمود. همچنین با افزایش زمان غوطه وری در محلول هیدروکسید سدیم از ۶۰ به ۱۵۰ دقیقه، میزان این پارامتر افزایش و سپس کاهش پیدا نمود. بطور کلی، دما باعث شکسته شدن پیوندهای پلی پپتیدی و سهولت در جداسازی پروتیین های با وزن مولکولی بالا در ژلاتین های استخراجی می گردد. در سطوح بالاتر حرارت، عاملی برای شکسته شدن پلی پپتیدهای با وزن مولکولی بالا شده و عملیات تخریب زنجیره های پلی پپتیدی با سرعت بالاتری صورت می پذیرد. همچنین با افزایش زمان غوطه وری، میزان دسترسی هیدروکسید سدیم بر روی پروتیین های فلس افزایش یافته، به طوری که در زمان های اولیه، این ترکیب باعث تجزیه باندهای پلی پپتیدی، تجزیه چربی ها و رنگدانه های موجود در آن گردید. در سطوح بالاتر زمان، بتدریج پلی پپتیدهای ایجاد شده توسط هیدروکسید سدیم دچار تجزیه جزئی شده، وزن مولکولی محلول ژلاتینی کاهش و در نتیجه ویسکوزیته روند نزولی پیدا نمود [۵،۱۵،۲۰،۲۱]. با توجه به نتایج آنالیز واریانس مشاهده گردید که تاثیر دمای استخراج نسبت به زمان غوطه وری در هیدروکسید سدیم در روند کاهشی ویسکوزیته بیشتر بود. ژو و رگنستین (۲۰۰۵) گزارش نمودند که غلظت های مختلف یون های هیدروژن و هیدروکسیل تاثیر معنی داری روی تغییرات ویسکوزیته ژلاتین پوست ماهی پولاک الاسکا داشتند [۲۲]. ویسکوزیته ژلاتین فلس ماهی سفید، دارای مقادیر بالاتری از پژوهش های مرتبط با سایر محققین می باشد. به عنوان مثال در پوست ماهی تیلایپا (۱/۷۳ میلی پاسکال بر ثانیه) و نیز ماهی سردابی (۱/۵۵ میلی پاسکال بر ثانیه) گزارش گردید [۲۳،۲۲]. زمان غوطه وری و غلظت هیدروکسید سدیم (اثرات خطی، متقابل و درجه دوم) بر روی تغییرات ویسکوزیته تاثیر معنی

داری در سطح ۱ درصد معنی دار داشتند. تفاوت ناچیزی بین داده های پیش بینی شده و تجربی در مورد ویسکوزیته نشان دهنده برآزش بالای داده های آزمایشگاهی با مدل آماری سطح پاسخ بود.

Table 3 ANOVA results obtained by Box-Benken design for viscosity of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	3.30	9	0.37	44.35	< 0.0001	significant
<i>A-SH, C</i>	0.41	1	0.41	49.53	0.0002	
<i>B-S, T</i>	0.68	1	0.68	82.78	< 0.0001	
<i>C-E, T</i>	0.14	1	0.14	16.67	0.0047	
<i>AB</i>	0.56	1	0.56	68.03	< 0.0001	
<i>AC</i>	9.025E-003	1	9.025E-003	1.09	0.3309	
<i>BC</i>	0.22	1	0.22	26.72	0.0013	
<i>A²</i>	0.14	1	0.14	17.19	0.0043	
<i>B²</i>	0.75	1	0.75	90.37	< 0.0001	
<i>C²</i>	0.27	1	0.27	32.79	0.0007	
Residual	0.058	7	8.268E-003			
<i>Lack of Fit</i>	0.058	3	0.019	2.78	0.0678	not significant
<i>Pure Error</i>	0.000	4	0.000			
Cor Total	3.36	16				

قدرت ژلی می باشد. ژلاتین ماهی دارای قدرت ژلی پایین تری نسبت به منابع حیوانی می باشد [۱۵]. در مطالعه اخیر، بالاترین استحکام ژل حدود ۱۴۸ گرم گزارش گردیده که در مقایسه با نتایج جمیله و هارویندر (۲۰۰۲) (۱۸۱ گرم)، میونگا و همکاران (۲۰۰۴) (۲۲۹ گرم) کمتر است [۲۳، ۲۴]. همچنین این مقدار از قدرت ژلی ماهی سالمون (۱۰۸ گرم) و کاد (۹۰ گرم) و پولاک الاسکا (۹۸ گرم) بیشتر بود [۲۲، ۴، ۱۵]. اثر متقابل دمای استخراج و غلظت هیدروکسید سدیم در شکل ۲b نشان داده شده است. با بررسی اثر دما و غلظت هیدروکسید سدیم در سطوح پایین این دو متغیر موجب افزایش و در سطوح بالاتر، کاهش قدرت ژلی را ایجاد می نمایند. با توجه به نتایج جدول آنوا، مشخص گردید که تاثیر دمای استخراج نسبت به غلظت هیدروکسید سدیم در تغییرات قدرت ژلی بیشتر بود. قدرت ژلی ژلاتین های تجاری با استفاده از مقادیر بلوم بیان می شود.

طبق شکل ۲a با افزایش غلظت هیدروکسید سدیم از ۰/۰۷۵ به ۰/۲۲۵ مولار و افزایش زمان غوطه وری از ۶۰ به ۱۸۰ دقیقه، در حالی که متغیر دیگر در نقطه مرکزی ثابت بوده، میزان در قدرت ژلی، ابتدا افزایش و در سطوح بالاتر کاهش یافت. با توجه به نتایج ضرایب رگرسیون مشاهده گردید که تاثیر زمان غوطه وری بر روی افزایش قدرت ژلی نسبت به غلظت هیدروکسید سدیم بیشتر بود. اثر متغیرهای مستقل بر روی قدرت ژلی در سطح ۱ درصد معنی دار بودند (جدول ۴). قدرت ژلی به عنوان یک فاکتور مهم در ارزیابی ژلاتین بوده و به نوعی کیفیت ژلاتین تولیدی را تعیین می نماید. از ژلاتین های با عدد بلوم پایین می توان در تولید پوشش های حساس به نور، میکروانکپسولاسیون، لعاب های با نقطه بستن پایین و فرمولاسیون شامپو استفاده نمود [۳، ۱۷، ۱۹]. ژو و رگستین (۲۰۰۵) اعلام نمودند که ژلاتین ها با عدد بلوم پایین، توانایی بالاتری نسبت به بلوم بالا در رهایش طعم دارند [۲۲]. آرنسون و گیلدبرگ (۲۰۰۷) بیان کردند که دو پارامتر مهم در تعیین خصوصیات فیزیکی ژلاتین، ویسکوزیته و

قدرت ژلی ژلاتین های تجاری ۱۰۰ تا ۳۰۰ بوده، اما ژلاتین های با مقادیر بلوم ۲۶۰-۲۵۰ گرم مطلوب تر هستند. اگر ژلاتین قدرت ژلی شدن خوبی داشته باشد، ژلاتین با بلوم قوی^۳، در غیر این صورت، ژلاتین با بلوم ضعیف^۴ نامیده می شود [۶،۱۲،۲۵،۲۶].

بوران و رگنستین (۲۰۰۹) اعلام نمودند که افزایش غلظت اسید از ۰/۱ تا ۱/۴۵ نرمال موجب کاهش استحکام ژل ژلاتین استخراجی از پوست ماهی فیتوفاگ گردید [۲۷]. همچنین وانگهویی و نامهورم (۲۰۰۹) گزارش نمودند که استحکام ژل ژلاتین فلوس مارمولک ماهی با بیشتر شدن سطوح یون هیدروکسیل، روند کاهشی پیدا نمود [۱۳]. در پژوهش حاضر با افزایش زمان غوطه وری در هیدروکسید سدیم و دمای استخراج، میزان قدرت ژلی ابتدا افزایش و سپس کاهش پیدا نمود (شکل ۲c). دلیل این امر را می توان این گونه تفسیر نمود که دماهای بالا می توانند موجبات تخریب پروتئین را فراهم آورده، بطوری که تولید فراگمنت های پروتئینی و کاهش قدرت ژلی را به همراه خواهند داشت [۷]. بالا رفتن دمای استخراج ۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد باعث بالا رفتن استحکام ژلی شده، در واقع دمای ۴۵ درجه دمای بهینه برای بالاترین قدرت ژلی بود. از دمای ۴۵ به ۵۰ درجه سانتی گراد بدلیل تجزیه کلاژن و تبدیل پروتئین ها به زنجیره های پلی پپتیدی با وزن مولکولی کم، میزان قدرت ژلی کاهش یافت. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که با افزایش هر کدام از متغیرهای مستقل، میزان استحکام ژلی ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. زمان های بالای غوطه وری در هیدروکسید سدیم و دماهای بالای استخراج و همچنین افزایش غلظت هیدروکسید سدیم سبب تجزیه پلی پپتیدها به ترکیبات با وزن مولکولی پایین تری شده که موجبات کاهش قدرت ژلی را فراهم می آورند [۱،۶]. مطالعات متعددی منتشر گردیده که تفاوت در قدرت ژلی ژلاتین های استخراج شده از گونه های مختلف ماهیان را گزارش می نماید. در اساس، به دلیل اختلاف در نحوه آماده سازی نمونه ها، روش اندازه گیری قدرت ژل، دمای اندازه گیری و تجهیزات مورد استفاده، نتایج برخی از مقالات با هم قابل مقایسه نمی باشد. تیمار با سطوح پایین متغیرهای مستقل

3. Frot bloom
4. Faible bloom

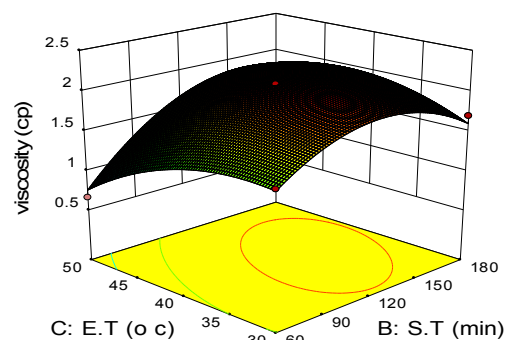
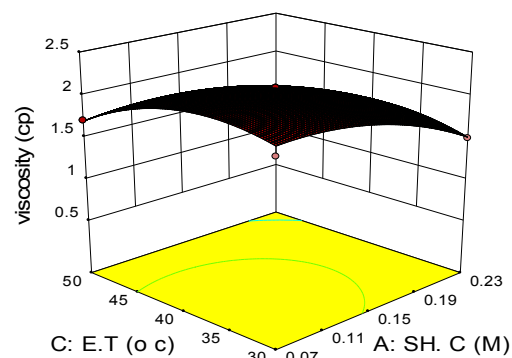
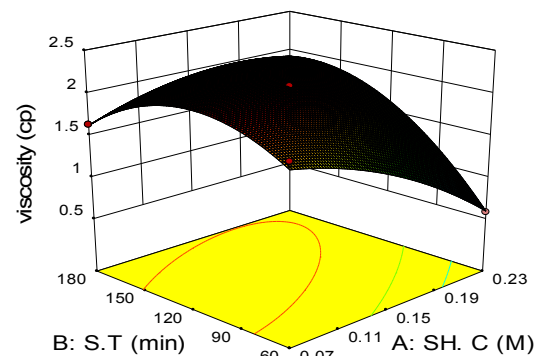


Fig 1 Response surface plots of viscosity of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
(a) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Soaking time (ST) (x_2) on viscosity of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
(b) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Extraction temperature (ET) (x_3) on viscosity of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
(c) Soaking time (ST) (x_2) and Extraction temperature (ET) (x_3) on viscosity of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

بیشتر آن ها در موقع سرد شدن می گردد. لذا، استخراج ژلاتین با عدد بلوم بالا قابل توجیه می باشد [۲۴،۲۸،۲۹].

شامل، غلظت هیدروکسید سدیم، زمان غوطه وری در هیدروکسید سدیم و دمای استخراج می تواند تولید فراکسیون های ژلاتینی با وزن مولکولی بالا گردیده که در ادامه باعث تجمع

Table 4 ANOVA results obtained by Box-Benken design for gel strength of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2980.99	9	331.22	35.53	< 0.0001	significant
<i>A-SH. C</i>	36.13	1	36.13	3.88	0.0897	
<i>B-S.T</i>	480.50	1	480.50	51.55	0.0002	
<i>C-E.T</i>	0.13	1	0.13	0.013	0.9111	
<i>AB</i>	20.25	1	20.25	2.17	0.1840	
<i>AC</i>	256.00	1	256.00	27.46	0.0012	
<i>BC</i>	20.25	1	20.25	2.17	0.1840	
<i>A²</i>	21.32	1	21.32	2.29	0.1742	
<i>B²</i>	1011.58	1	1011.58	108.52	< 0.0001	
<i>C²</i>	979.21	1	979.21	105.05	< 0.0001	
Residual	65.25	7	9.32			
<i>Lack of Fit</i>	65.25	3	21.75	1.37	0.0822	not significant
<i>Pure Error</i>	0.000	4	0.000			

نظیر چربی و کربوهیدرات می گردد. همچنین هیدروکسید سدیم عامل اصلی برای تغییر pH به سمت قلیایی شدن و تسریع انجام واکنش های قهوه ای شدن می باشد. افزایش غلظت این ترکیب و مدت زمان غوطه وری فلس در محلول هیدروکسید سدیم باعث ایجاد رنگدانه های قهوه ای و تیره در روی فلس گردید. ترکیبات کربونیل در داخل فلس وجود دارد. بیشتر شدن زمان غوطه وری فلس داخل محلول هیدروکسید سدیم، باعث می گردد مقادیر بالاتری از اسیدهای آمینه به فرم آزاد، کربونیل و آلدئید پدید آمده که می توانند واکنش های قهوه ای شدن آنزیمی مانند میلارد را افزایش دهند [۳۲،۳۳].

از طرفی دیگر، عامل بعدی در کاهش شفافیت ژلاتین های تولیدی، رنگدانه های باقیمانده بعد از عملیات قلیایی و معدنی زدایی بوده که می توانند در مرحله استخراج با آب مقطر وارد محلول ژلاتینی گردیده و میزان شاخص های قرمزی و زردی را افزایش دهند. در تحقیق حاضر، اثر متغیرهای مستقل بر روی شاخص های رنگی در سطح ۱ درصد معنی دار بودند (جداول ۵،۶،۷).

جانز (۱۹۷۷) اعلام نمود که ژلاتین مطلوب باید دارای رنگ کمی باشد [۳۰]. رنگ ژلاتین تحت تاثیر منبع اولیه آن قرار داشته و به خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن بستگی ندارد [۳۱]. با توجه به نتایج مشخص گردید که با افزایش دمای استخراج، غلظت و زمان غوطه وری در هیدروکسید سدیم، شاخص روشنایی ابتدا زیاد و در ادامه روند کاهش پیدا می نماید (شکل ۳a). اثر متقابل متغیرهای مستقل بر میزان شاخص های قرمزی و زردی، نشان داده شده است (شکل های ۴a تا ۴c: ۵a تا ۵c). شاخص a^* و b^* در سطوح بالای متغیرهای مستقل، روند افزایشی نشان دادند. به عبارت دیگر، در دماهای بالای استخراج، میزان روشنایی نمونه های ژلاتین با افزایش مداوم قرمزی و زردی کاهش پیدا نمود. اعمال حرارت بالا ممکن است واکنش های قهوه ای شدن آنزیمی را تا حد زیادی تحریک نماید. در واقع دمای بالای استخراج باعث تجزیه پروتئین ها و تولید اسیدهای آمینه آزاد نموده که در درجات بالای هیدرولیز بوجود می آیند. تاثیر یون هیدروکسیل روی ترکیبات ضایعات ماهی در بسیاری از پژوهش ها منتشر شده است [۲،۵،۲۱]. در واقع قلیا علاوه با شکستن زنجیره های پلی پپتیدی، موجب خروج ترکیبات غیر پروتئینی

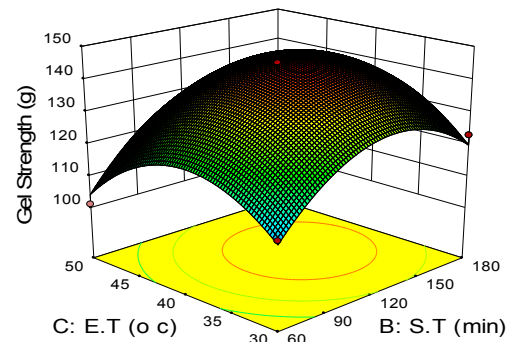
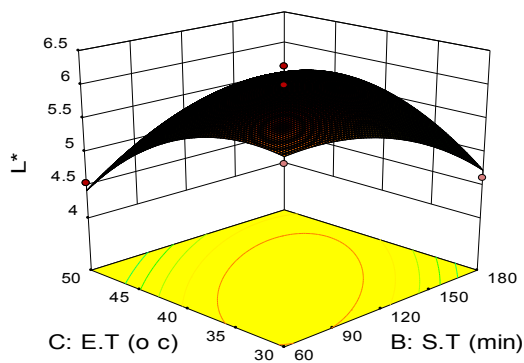
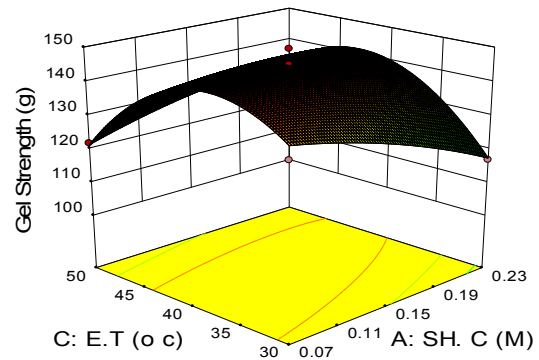
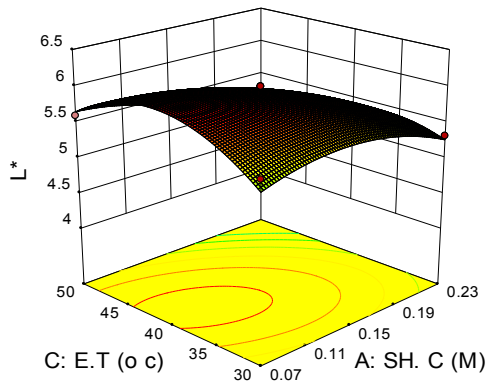
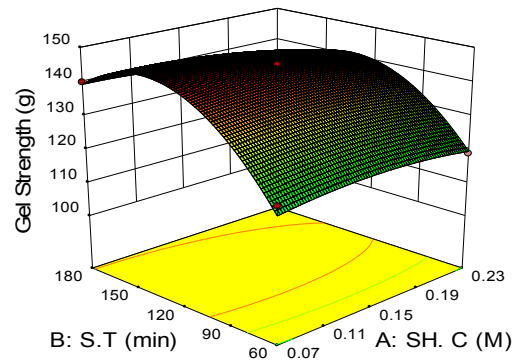
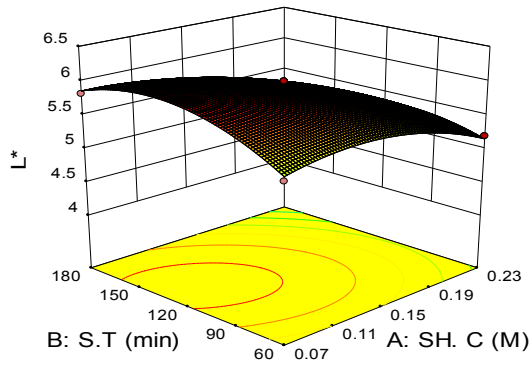


Fig 3 Response surface plots of L* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (a) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Soaking time (ST) (x_2) on L* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (b) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Extraction temperature (ET) (x_3) on L* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (c) Soaking time (ST) (x_2) and Extraction temperature (ET) (x_3) on L* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

Fig 2 Response surface plots of gel strength of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (a) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and soaking time (ST) (x_2) on gel strength of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (b) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Extraction temperature (ET) (x_3) on gel strength of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (c) Soaking time (ST) (x_2) and Extraction temperature (ET) (x_3) on gel strength of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

Table 5 ANOVA results obtained by Box-Benken design for L* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	4.70	9	0.52	29.58	< 0.0001	significant
A-SH. C	0.92	1	0.92	51.97	0.0002	
B-S.T	1.250E-003	1	1.250E-003	0.071	0.7979	
C-E.T	0.17	1	0.17	9.36	0.0183	
AB	0.13	1	0.13	7.13	0.0319	
AC	0.27	1	0.27	15.31	0.0058	
BC	1.16	1	1.16	65.42	< 0.0001	
A ²	0.32	1	0.32	17.96	0.0038	
B ²	0.54	1	0.54	30.38	0.0009	
C ²	1.01	1	1.01	57.12	0.0001	
Residual	0.12	7	0.018			
Lack of Fit	0.11	3	0.037	2.98	0.0558	Not significant
Pure Error	0.012	4	2.880E-003			

Table 6 ANOVA results obtained by Box-Benken design for a* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	60.56	9	6.73	11.16	0.0022	significant
A-SH. C	2.89	1	2.89	4.80	0.0646	
B-S.T	3.34	1	3.34	5.54	0.0508	
C-E.T	11.47	1	11.47	19.03	0.0033	
AB	0.99	1	0.99	1.64	0.2408	
AC	0.72	1	0.72	1.20	0.3098	
BC	7.24	1	7.24	12.00	0.0105	
A ²	5.25	1	5.25	8.70	0.0214	
B ²	5.48	1	5.48	9.10	0.0195	
C ²	20.08	1	20.08	33.31	0.0007	
Residual	4.22	7	0.60	1.71	0.3941	not significant
Lack of Fit	4.22	3	1.41			
Pure Error	0.000	4	0.000			

Table 7 ANOVA results obtained by Box-Benken design for b* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	694.70	9	77.19	11.88	0.0018	significant
A-SH. C	84.18	1	84.18	12.95	0.0087	
B-S.T	39.87	1	39.87	6.14	0.0424	
C-E.T	187.70	1	187.70	28.88	0.0010	
AB	1.18	1	1.18	0.18	0.6832	
AC	42.77	1	42.77	6.58	0.0372	
BC	130.07	1	130.07	20.02	0.0029	
A ²	31.84	1	31.84	4.90	0.0625	
B ²	35.96	1	35.96	5.53	0.0509	
C ²	121.87	1	121.87	18.75	0.0034	
Residual	45.49	7	6.50			
Lack of Fit	45.49	3	15.16	0.066	0.8332	not significant
Pure Error	0.000	4	0.000			
Cor Total	740.19	16				

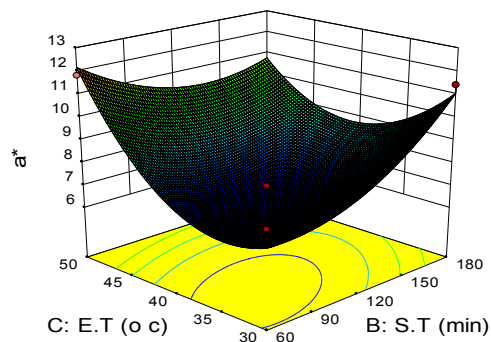
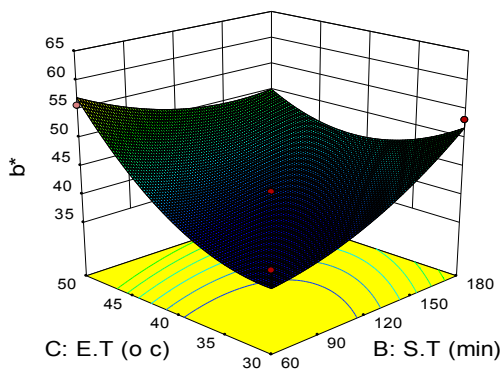
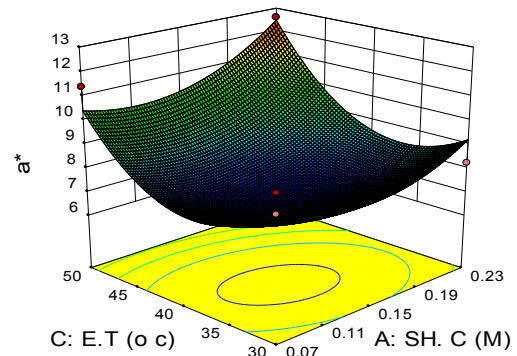
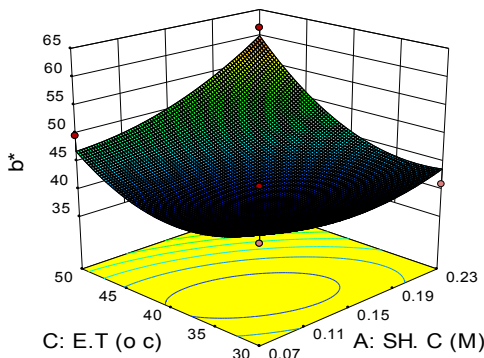
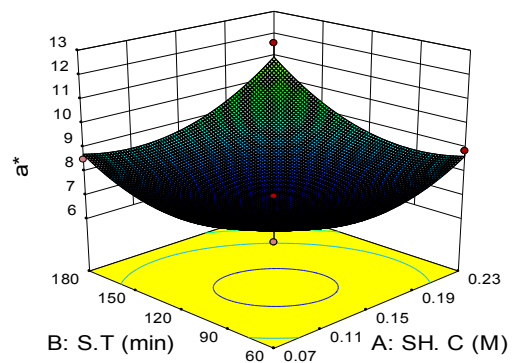
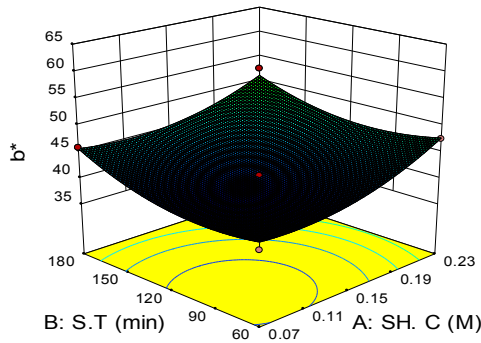


Fig 5 Response surface plots of b^* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (a) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Soaking time (ST) (x_2) on b^* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (b) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Extraction temperature (ET) (x_3) on b^* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (c) Soaking time (ST) (x_2) and Extraction temperature (ET) (x_3) on b^* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

Fig 4 Response surface plots of a^* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (a) Hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Soaking time (ST) (x_2) on a^* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (b) Sodium hydroxide concentration (SH.C) (x_1) and Extraction temperature (ET) (x_3) on a^* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale
 (c) Soaking time (ST) (x_2) and Extraction temperature (ET) (x_3) on a^* of gelatin extracted from Caspian whitefish scale

است که مدل ایجاد شده تغییرات در داده ها را به اندازه کافی توضیح دهد [۳۴]. در پژوهش حاضر R^2 برای پارامترهای ویسکوزیته، قدرت ژلی، شاخص روشنایی، قرمزی و زردی به ترتیب ۰/۹۸، ۰/۹۷، ۰/۹۷، ۰/۹۳ و نیز ۰/۹۴ بدست آمده که بیانگر این مطلب بوده که مدل درجه دوم توانست با دقت بالا تغییرات متغیرهای وابسته را تخمین بزند. با توجه به نتایج بدست آمده از آنالیز آماری، مدل چند جمله‌ای درجه دوم بدست آمده توانایی پیش بینی اثرات متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته را دارد (جدول ۸).

به منظور حصول مدل برای پیش بینی پاسخ های مورد آزمون در این پژوهش، رابطه‌های خطی و چند جمله‌ای درجه دوم با استفاده از داده های تجربی برازش شدند. سپس این مدل‌ها مورد آنالیز آماری قرار گرفته تا مدل مناسب گزینش گردد. ضریب تعیین (R^2) به عنوان نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می‌شود که معیاری از درجه تناسب برازش می‌باشد. بنابراین هر چقدر R^2 به یک نزدیک تر شود قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد. برای یک مدل با برازش خوب مقدار R^2 بایستی حداقل ۰/۸ باشد. برازش خوب به این معنی

Table 8 Regression coefficients for 2nd order response surface models in terms of uncoded unit

Factor	viscosity	gel strength	L*	a*	b*
Intercept	2.09	145	5.964	6.95	40.5
A-SH. C	-0.22625	-2.125	-0.33875	0.60125	3.24375
B-S.T	0.2925	7.75	0.0125	0.64625	2.2325
C-E.T	-0.13125	-0.125	-0.14375	1.1975	4.84375
AB	0.375	-2.25	-0.1775	0.4975	-0.5425
AC	0.0475	8	-0.26	0.425	3.27
BC	0.235	2.25	0.5375	-1.345	-5.7025
A ²	-0.18375	-2.25	-0.2745	1.11625	2.75
B ²	-0.42125	-15.5	-0.357	1.14125	2.9225
C ²	-0.25375	-15.25	-0.4895	2.18375	5.38

شرایط بهینه توسط نرم افزار انتخاب گردید. شرایط بهینه شامل غلظت هیدروکسید سدیم ۰/۱۱ مولار، زمان غوطه وری ۱۱۶ دقیقه و دمای استخراج ۳۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (شکل ۶). سالانه حجم بالایی از ماهی سفید در استان های مازندران و گیلان صید گردیده که دارای ضایعات غنی از ژلاتین نظیر فلس و استخوان می باشد. این ترکیبات عملاً در کارخانجات به پودر یا آرد ماهی تبدیل شده که دارای مصرف دام و یا طیور بوده، یا اینکه در بازارهای محلی عمدتاً به فاضلاب ریخته می شوند. اما با استخراج ژلاتین با هزینه پایین علاوه بر ارز آوری، می توان خطرات زیست محیطی این ضایعات را تقلیل داد.

۴- نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که هر کدام از متغیرهای مستقل تاثیر معنی داری روی میزان ویسکوزیته داشتند. در سطوح پایین هر کدام از متغیرها، ویسکوزیته روند صعودی و در ادامه کاهش نشان داد. همین روند در مورد قدرت ژلی مشاهده گردید. شاخص روشنایی با افزایش دمای استخراج، زمان غوطه وری و غلظت هیدروکسید سدیم روند نزولی نشان داد، در حالی که a و b ، با افزایش هر پارامتر روند صعودی نشان داد. شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج ژلاتین از فلس ماهی سفید با استفاده از تکنیک بهینه سازی عددی با نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۰ بررسی گردید. بدین منظور در ابتدا

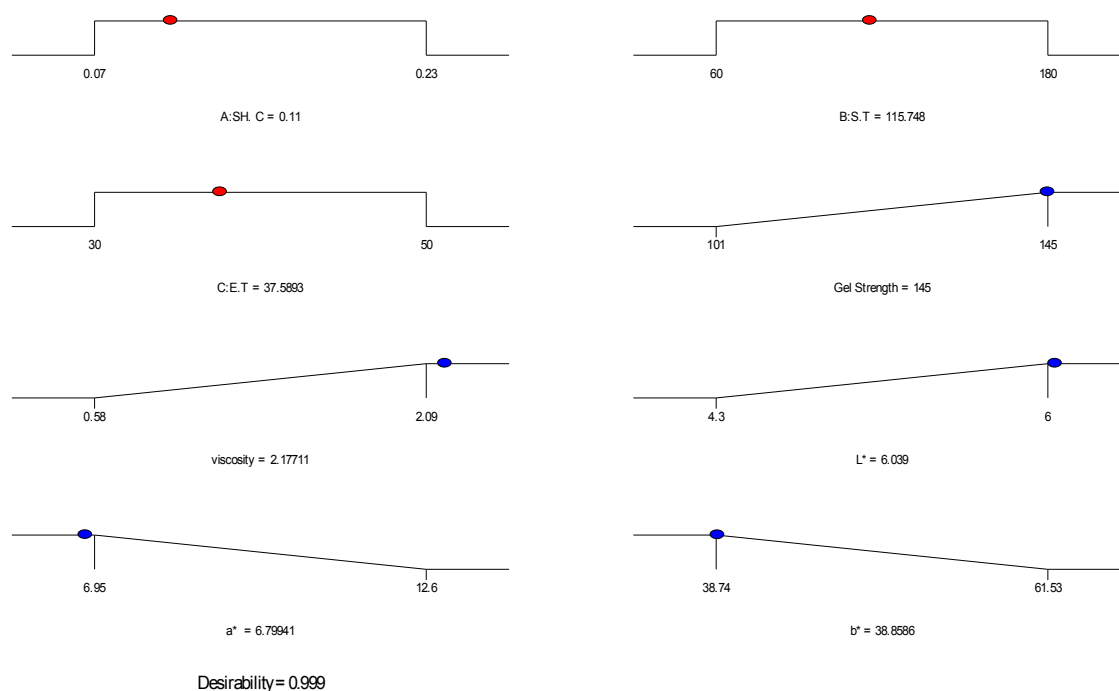


Fig 6 Optimization results for determination of conditions extraction gelatin from Caspian whitefish scale

۵- منابع

- gelatin of Beluga Sturgeon (*Huso huso*) from The Caspian Sea. *Annals of Biological Research*, 4(70), 227-234.
- [6] Karim, A. A., & Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food hydrocolloids*, 23(3), 563-576.
- [7] Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food chemistry*, 89(3), 363-372.
- [8] Leuenberger, B. H. 1991. Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. *Food hydrocolloids*, 5(4), 353-361.
- [9] Limpisophon, K., Tanaka, M., Weng, W., Abe, S., and Osako, K. 2009. Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1993-2000.

- [1] Gilsean, P.M., and Ross-Murphy, S.B. 2000. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14, 191-195.
- [2] Mahjoorian, A., Saeedi Asl, M. R., Rezaie, M., Mortazavi, S. A., & Ariaii, P. 2018. Physico-mechanical and antimicrobial properties of edible film incorporated with caryophyllum aromaticus essential oil (CEO) from Caspian White fish (*Rutilus frisii* Kutum) scale. *Food Hygiene*, 3(31), 57-72. [In Persian].
- [3] Abromand, A. 1989. Gelatin production from fishery wastage, M.Sc. Thesis. Tarbiat Modares University, Tehran. Iran. [In Persian].
- [4] Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., and Montero, P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.
- [5] Mahjoorian, A., Mortazavi, S. A., Tavakolipour, H., Motamedzadegan, A., & Askari, B. 2013. Rheological properties of skin

- properties. *Journal of Food Science and Technology*, 15(84), 429-439. [In Persian].
- [22] Zhou, P., & Regenstein, J. M. 2005. Effects of alkaline and acid pre Soakings on Alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*, 70(6), 392-396.
- [23] Jamilah, B., Harvinder, K. G. 2002. Properties of gelatins from skins of fish—black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food chemistry*, 77(1), 81-84.
- [24] Muvonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. 2004. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food hydrocolloids*, 18(4), 581-592.
- [25] Hinterwaldner, R. 1977. Technology of gelatin manufacture. In: *The Science and Technology of Gelatin*. A.G. Ward and A. Courts, eds, Academic Press, London .
- [26] Cao, N., Fu, Y., & He, J. 2007. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1153-1162.
- [27] Boran, G., & Regenstein, J. M. 2009. Optimization of gelatin extraction from silver carp skin. *Journal of food science*, 74(8), 432-441.
- [28] Schrieber, R., & Gareis, H. 2007. Gelatine handbook: theory and industrial practice. John Wiley & Sons. . New York.
- [29] Badii, F. and Howell, N.K. 2006. Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 630-640.
- [30] Johns, P. 1977. The structure and composition of collagen containing tissues. In: *The Science and Technology of Gelatin*. A.G. Ward and A. Courts, eds, Academic Press, London.
- [31] Jamilah, B., Tan, K. W., Hartina, M. U., & Azizah, A. 2011. Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food hydrocolloids*, 25(5), 1256-1260.
- [32] Milovanovic, I., & Hayes, M. 2018. Marine Gelatine from rest raw materials. *Applied Sciences*, 8(12), 2407.
- [33] Schrieber, R., & Gareis, H. 2007. Gelatine handbook: theory and industrial practice. John Wiley & Sons, New York.
- [34] Zar, J. H. 2013. *Biostatistical analysis: Pearson new international edition*. Pearson Higher Ed.
- [10] Muvonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. 2004. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food hydrocolloids*, 18(4), 581-592.
- [11] Jalili, S. H. 2004. Effects of acetic and hydrochloric acids on the yield and quality of gelatin extracted from skin of sting ray (*Himantura gerrardi*). *Pajouhesh and Sazandegi*, 65, 49-56. [In Persian].
- [12] Alavi Talab, H., Tavakolipour, H. and Ghoroghi, A. 2006. Investigation and comparison of quality of Fitofague's skins & fins acidic and alkaline gelatin with another source. *Pajouhesh and Sazandegi*, 72, 50-57. [In Persian].
- [13] Wangtueai, S., & Noomhorm, A. 2009. Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida spp.*) scales. *LWT-Food Science and Technology*, 42(4), 825-834.
- [14] Montgomery, D. C. 2009. Introduction to statistical quality control. John Wiley & Sons , New York.
- [15] Arnesen, J. A., & Gildberg, A. 2007. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, 98(1), 53-57.
- [16] Khan, N. H., Korber, D. R., Low, N. H., & Nickerson, M. T. 2013. Development of extrusionbased legume protein isolate–alginate capsules for the protection and delivery of the acid sensitive probiotic, *Bifidobacterium adolescentis*. *Food Research International*, 54, 730–737.
- [17] Ward, A. G. and Courts, A. 1977. The science and technology of gelatin. Academic press. London.
- [18] Stainsby, G. 1977. The gelatin gel and the sol-gel transformation. In: *The Science and Technology of Gelatin*. A.G. Ward and A. Courts, eds, Academic Press, London.
- [19] Cole, C.G.B. 2000. Gelatin. Encyclopedia of food science and technology. John Wiley & Sons, New York.
- [20] Alfaro, A.T., Biluca, F.C., Marquetti, C., Tonial, I.B. and de Souza, N.E. 2014. African catfish (*Clarias gariepinus*) skin gelatin: Extraction optimization and physical–chemical properties. *Food research international*, 65, 416-422.
- [21] Mahjorian, A. Nourozi, M., & Mokhtarian, M. 2018. The extraction of gelatin from Caspian Sea (*Huso Huso*) skin and survey its rheological

Optimization of extraction conditions of gelatin from Caspian whitefish (*Rutilus frisii kutum*) scale

Mahjoorian, A.¹, Saeedi Asl, M. R.^{2*}, Jafarian, S.³, Taha Nezhad, M.¹, Gol Zadeh, B.⁴

1. Department of Agricultural Engineering and Technology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
2. Department of Food Science & Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
3. Department of Food Science & Technology, Savadkooh Branch, Islamic Azad University, Savadkooh, Iran
4. Department of Chemistry, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

(Received: 2019/09/17 Accepted:2019/12/15)

Gelatin has many applications in the food, pharmaceutical and cosmetic industries due to its technological and functional properties. By-products from fish cleaning are rich sources of collagen. The physical, chemical and rheological properties of gelatin or collagen depend on their sources as well as the extraction conditions. Response surface methodology (RSM) with three parameters was conducted to determine the optimum extraction conditions of gelatin from Caspian whitefish scale. A Box-Behnken design was used to study the combined effects of sodium hydroxide concentration (0.075-0.225 M), soaking time in sodium hydroxide solution (60-180 minute), and extraction temperature (30-50 °C) were determined. Viscosity (cp), gel strength (g), L*, a*, and b* were chosen as responses. The results showed the optimum conditions were sodium hydroxide concentration 0.11 M, soaking time in sodium hydroxide solution of 116 minutes, and extraction temperature of 38 °C. The predicted responses including viscosity, gel strength, L*, a*, and b* were 2.17 cP, 145 g, 6.03, 6.80, and 38.85 respectively. The response surface method was able to estimate the optimal conditions of extraction gelatin with high desirability (0.99).

Keywords: Gelatin, By-products, Box–Behnken design, Gel strength, Viscosity.

* Corresponding Author E-Mail Address: mrezasaeidi@yahoo.com