

# استخراج ژلاتین از پوست فیل ماهی دریای خزر (*Huso huso*) و بررسی خصوصیات رئولوژیکی آن

عباس مهجوریان<sup>۱\*</sup>، محمد نوروزی<sup>۲</sup>، محسن مختاریان<sup>۳</sup>

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲- استادیار گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۰۷)

## چکیده

ژلاتین یکی از مواد پروتئینی کلونیدی بوده که مصارف گسترده ای در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و نظامی دارد. سالانه مقادیر قابل ملاحظه‌ای از آن برای مصارف مختلف وارد کشور می‌گردد. از طرفی دریای خزر از بزرگترین منابع غنی از ماهیانی مانند فیل ماهی، کپور، ماهی سفید و غیره بوده که مقادیر قابل توجهی از باقیمانده‌های آنها تحت عنوان ضایعات هدر می‌رود که می‌تواند منبع مناسبی برای استخراج ژلاتین باشد. در این مطالعه تأثیر روش‌های مختلف استخراج ژلاتین (I، II، III و IV) از پوست فیل ماهی مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین نقطه ذوب، بازده استخراج و ویسکوزیته مطلق ژلاتین به ترتیب در روش‌های استخراج II، III و III مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که ویسکوزیته ژلاتین با افزایش غلظت هیدروکسید سدیم کاهش (روش‌های II و IV)، و با مقادیر کمتر آن (روش‌های I و III)، افزایش می‌یابد. همچنین با استفاده از معادله آرنیوس تابعیت ویسکوزیته ژلاتین با دما تعیین و انرژی فعال‌سازی بین ۱۶۷۳۱ تا ۳۲/۶۶ kJ/mol محاسبه شد. در نهایت با استفاده از مدل‌های نمایی و توانی ویسکوزیته ژلاتین با بریکس برازش گردید. نتایج مدلسازی نشان داد که مدل نمایی از دقت بالاتری در پیش‌بینی ویسکوزیته مطلق ژلاتین برخوردار بود.

**کلید واژگان:** ژلاتین، فیل ماهی، راندمان استخراج، خصوصیات رئولوژیکی.

\* مسئول مکاتبات: pnamari@gmail.com

## ۱- مقدمه

ژلاتین یک ماده پروتئینی کلوئیدی و از قدیمی‌ترین بیوپلیمری است که از هیدرولیز کلاژن موجود در پوست، استخوان و بافت پیوندی حیوانات از جمله دام، طیور و آبزیان بدست می‌آید. ژلاتین به طور وسیعی در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و نظامی مورد استفاده قرار گرفته و در چهار درجه متفاوت خوراکی، فوتوگرافی و دارویی تولید می‌شود [۱،۲]. در صنایع غذایی در تهیه مارمالادها، زله‌ها، شیرینی‌جات، بستنی‌ها و شفاف سازی آب‌میوه‌جات (به‌خصوص آب سیب از طریق خشی کردن بار منفی پلی‌ساکاریدها که یکدیگر را می‌رانند، سبب ترسیب ناخالصی‌ها و شفاف‌سازی می‌شود) و غیره بکار می‌رود که به آسانی در بدن جذب شده و به هضم سایر مواد غذایی از طریق تشکیل امولسیون با چربی‌ها و پروتئین‌ها کمک می‌نماید. در غذاهای مخصوص افراد دیابتی به منظور کاهش سطح کربوهیدرات نیز بکار می‌رود. ژلاتین در صنایع داروسازی برای تهیه بخش پُرکننده قرص‌ها و همچنین تهیه کپسول‌های دارویی بکار می‌رود. همچنین ژلاتین در صنعت فیلم‌سازی و صنایع فتوگرافی امولسیون‌های حاوی نمک‌های نقره ساخته که در مقابل نور حساس است و از این رو نقش بارزی در این صنایع دارد. ژلاتین در صنایع دیگر نظیر نساجی، تهیه چسب، کبریت‌سازی، مرکب چاپ، کاغذ پلی‌کپی، کارتن‌سازی و در ساخت فیلتر لامپ‌های جیوه‌ای بکار می‌رود. در پزشکی نیز در انعقاد خون، جانشینی برای سرم خون، پوشاننده لایه داخلی معده و روده و در تهیه محیط کشت باکتریایی استفاده می‌شود. برخی از پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه استخراج ژلاتین از منابع تولید کننده آن، به شرح ذیل می‌باشد [۳،۴]. علوی طلب و همکاران (۱۳۸۵) کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی پوست و باله کپور فیتوفاگ<sup>۱</sup> (نقره‌ای) را مطالعه نمودند نتایج نشان داد که ژلاتین قلیایی کپور نقره‌ای در مقایسه با ژلاتین اسیدی آن از کیفیت بهتری برخوردار است [۲]. جلیلی (۱۳۸۳) تاثیر تیمارهای مختلف با اسیدهای کلریدریک و استیک را بر کیفیت و راندمان استخراج ژلاتین از پوست سپر ماهی گزنده (*Himantura gerrardi*) مطالعه

نمودند. نتایج نشان داد که تیمار اسید کلریدریک با غلظت ۰/۴ درصد و در درجه حرارت ۷۰ درجه سانتیگراد و زمان ۹۰ دقیقه دارای عملکرد بهتری بود. راندمان استحصال ژلاتین با این تیمار ۱۵/۶ درصد برآورد گردید [۱]. سومی و همکاران (۲۰۱۵) تاثیر غلظت اسید استیک و دمای استخراج را روی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ژلاتین استحصال از پوست خوک را مطالعه نمودند. نتایج نشان داد که تاثیر متقابل اسید استیک و دمای استخراج بر روی قدرت ژل، ویسکوزیته، میزان پروتئین و pH ژلاتین استحصال شده از پوست خوک معنی‌دار ( $p > 0.05$ ) نبود. بهترین غلظت اسید استیک و دمای استخراج به ترتیب ۰/۴٪ و ۵۵ درجه سانتیگراد برآورد گردید [۵]. آلفارو و همکاران (۲۰۱۴) خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ژلاتین استخراج شده از پوست گربه ماهی (*Clarias gariepinus*) آفریقایی را مطالعه نمودند. نتایج نشان داد که خصوصیات راندمان استخراج، مقاومت ژل ژلاتین و نقطه ذوب ژلاتین استحصال به ترتیب ۱۱/۴ درصد، ۲۳۴ گرم و ۲۵/۷ درجه سانتیگراد تعیین گردید [۶]. فیل ماهی یا بلوگا (*Huso huso*)، از راسته تاس‌ماهیان، بزرگ‌ترین ماهی دریای خزر است. زیستگاه اصلی این آبزی دریای خزر و دریای سیاه است. در حال حاضر روند صید ماهیان خاویاری ایران رو به کاهش است؛ به طوری که از حدود ۲۱۰۰ تن در سال ۱۳۷۱ به حدود ۲۰ تن در سال ۱۳۹۲ رسیده است که کاهش حدود ۱۰۰ درصدی داشته است. با ادامه این روند میزان صید به کمترین حد خود، ۱۴ تن در سال ۱۳۹۴ رسید. درصد صید گونه‌ای ماهیان خاویاری از سال ۱۳۷۱ تا ۱۳۹۲ متغیر بوده است. در سال ۱۳۷۱ سهم صید فیل‌ماهی ۹،۶ درصد گزارش گردید. مهجوریان و همکاران (۲۰۱۳) میزان راندمان تولید ژلاتین از پوست فیل ماهی بین ۱۲ تا ۲۳ درصد اعلام نمودند [۷]. در مطالعه حاضر خصوصیات فیزیکی ژلاتین استحصال از پوست فیل ماهی (بلوگا استروژن) دریای خزر (*Huso huso*) به دو روش اسیدی و قلیایی بهینه‌سازی و ویژگی‌های رئولوژیکی ژلاتین تولید بر حسب تابعی از دما و غلظت مدلسازی گردید.

## 1. Fitofague

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- مواد

پوست فیل ماهی تازه از شرکت کیان ماهی خزر، بابلسر تهیه گردید. پوست‌ها در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایشات نگهداری شد. ترکیبات شیمیایی استفاده شده در این پژوهش (اسید استیک و هیدروکسید سدیم) ساخت شرکت مرک آلمان بود.

## ۲-۲- فرآیند آماده‌سازی و استخراج ژلاتین

پوست فیل ماهی تازه منجمد در دمای ۴ °C به مدت ۲۰ ساعت رفع انجماد شد. سپس به قطعات با ابعاد ۳×۴ cm (به ترتیب طول و عرض) برش و در یک ظرف آب با دمای ۴ °C به مدت ۱۰ دقیقه، دو الی سه مرتبه شستشو گردید (نسبت آب به پوست فیل ماهی ۶ به ۱ وزنی/حجمی). سپس پوست‌های فیل ماهی به منظور حذف آب اضافی به مدت ۵ دقیقه در یک پارچه قرار گرفت و در دمای ۱۸ °C منجمد گردید. ۵۰ گرم پوست ماهی رفع انجماد شده به نسبت ۵ به ۱ (وزنی/حجمی) در یک بشر حاوی غلظت‌های مختلف محلول هیدروکسید سدیم (۰/۲ تا ۲ مولار)، به مدت یک ساعت در دمای ۷ °C، به منظور حذف چربی و پروتئین‌های غیر کلاژنی و نیز جلوگیری از پروتولیز کلاژن غوطه‌ور شد. مخلوط فوق به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق (۲۸-۳۰ °C) توسط همزن مغناطیسی، تکان داده شد. محلول قلیایی هر یک ساعت توسط محلول تازه جایگزین گردید. پوست‌های تیمار شده سپس توسط آب سرد به منظور تعدیل pH و رسیدن به مقدار طبیعی شستشو شد. سپس باقیمانده‌ها در محلول اسید استیک (۰/۲ تا ۲ مولار) به نسبت ۵ به ۱ (وزنی/حجمی) به منظور تورم مواد کلاژنی پوست فیل ماهی غوطه‌ور و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق (۲۸-۳۰ °C) توسط همزن مغناطیسی مخلوط شد. بعد از اتمام زمان اختلاط، نمونه‌ها به منظور تعدیل pH و رسیدن به مقدار طبیعی توسط آب سرد شستشو شدند. روش فوق سه مرتبه تکرار شد. نهایتاً پوست‌های متورم شده به منظور استخراج ژلاتین با آب مقطر به نسبت ۱۰ به ۱ (وزنی/حجمی) مخلوط، و در حمام آب (M Emmert, WB14, Germany) با دمای ۴۵-۵۵ °C به مدت ۱۶-۱۸

ساعت قرار گرفت. مخلوط فوق سپس توسط قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره ۴ (Whatman International, Ltd., Maidstone, England) صاف شد. سپس مخلوط صاف شده توسط خشک‌کن تحت خلاء (M Emmert, VO400, Germany) در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱۸۰ mbar خشک گردید. نمونه‌های ژلاتین استحصال‌ی فوراً مورد اندازه‌گیری قرار گرفت [۷].

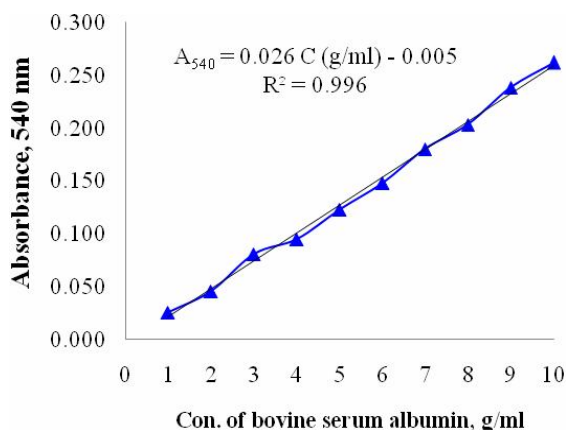
## ۲-۳- بازده پروتئین

غلظت پروتئین محلول به روش بیورت توسط اسپکتروفوتومتر (PG Instruments, T80+UV-VIS, UK) در طول موج ۵۴۰ nm با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) (Zistchimi, Tehran, Iran) به عنوان استاندارد تعیین شد. به منظور بدست آوردن بهترین معادله خط برای منحنی استاندارد، غلظت آلبومین سرم گاوی از ۱۰-۱ g/ml، افزایش یافت. منحنی کالیبراسیون آلبومین سرم گاوی در شکل ۱ ارائه شده است. بازده استخراج ژلاتین توسط معادله (۱) تعیین شد.

(۱)

$$Y_p (\%) = \frac{GC \times SV}{W} \times 100$$

در این معادله،  $Y_p$  بازده استخراج ژلاتین (%)، GC غلظت ژلاتین در محلول استخراج شده (g/ml)، SV حجم عصاره (ml) و W وزن نمونه بکار رفته برای استخراج (g) است [۶].



**Fig 1** Calibration curve for bovine serum albumin,  $A$  is absorbance in 540 nm and  $C$  is the concentration of BSA in g/ml.

## ۲-۴- نقطه ذوب

جهت تعیین تابعیت ویسکوزیته با دما از رابطه آرنیوس استفاده و ثابت‌های معادله تعیین شد.

(۴)

$$\mu_T = \mu_\infty \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right)$$

با گرفتن لگاریتم طبیعی از دو طرف معادله (۴) داریم:

(۵)

$$\ln \mu_T = \ln \mu_\infty + \ln \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T}$$

در این معادله،  $T\mu$  ویسکوزیته ژلاتین در دمای  $T$  (Pa.s)،  $\mu_\infty$  ویسکوزیته در دمای بی‌نهایت (Pa.s)،  $E_a$  انرژی فعالسازی (kJ/mol)،  $R$  ثابت جهانی گاز ( $8.314 \times 10^{-3}$  kJ/mol.K) و  $T$  دمای مطلق (K) است. با رسم نمودار  $\ln \mu$  بر حسب عکس دمای مطلق ( $T^{-1}$ ) ویسکوزیته در دمای بی‌نهایت و انرژی فعالسازی تعیین می‌گردد [۹].

## ۲-۵-۲- تابعیت ویسکوزیته با غلظت

یکی دیگر از پارامترهایی که در این قسمت قابل بررسی خواهد بود مقایسه تغییرات ویسکوزیته نمونه‌ها نسبت به غلظت می‌باشد. در این قسمت به منظور بررسی رابطه ویسکوزیته با غلظت از دو تابع نمایی و توانی به شکل زیر استفاده گردید:

تابع نمایی:

(۶)

$$\mu_C = \mu_{0C} \exp(BC)$$

تابع توانی:

(۷)

$$\mu_C = \mu_{0C} C^B$$

در معادلات (۶) و (۷)،  $\mu_{0C}$  ویسکوزیته ژلاتین در غلظت  $C$  (Pa.s)،  $\mu_{0C}$  ثابت پیش‌نمایی (Pa.s)،  $C$  غلظت یا بریکس ژلاتین (g/l) و  $B$  یک ضریب با واحد عکس غلظت است.

## ۲-۶- تعیین الگوی ژل الکتروفورز به روش

سدیم دو دسیل سولفات-پلی آکریل آمید

## (SDS-PAGE)

برای مشاهده ایزوفرم‌های ژلاتین و نیز تعیین وزن مولکولی آن از روش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (به دلیل قدرت تفکیک بالا،

نقطه ذوب ژلاتین استحصالی طبق روش ژوی و رگنستین (۲۰۰۵) انجام گرفت. بدین منظور محلول ژلاتین به غلظت ۳/۳۳٪ آماده شد و ۵ ml از آن به یک لوله آزمایش کوچک منتقل شد. لوله آزمایش در یک حمام آب در دمای  $60^\circ\text{C}$  برای ۱۵ دقیقه گرم شد، سپس لوله در حمامی از یخ سرد شد و برای سرد کردن تکمیلی در یخچال با دمای  $10^\circ\text{C}$  به مدت  $1 \pm 1$  h صورت گرفت. پنج قطره معرف رنگی حاوی ۷۵٪ کلروفورم و ۲۵٪ متیلن بلو به ژل افزوده شد. ژل بسته شده در حمام آب (با دمای اولیه  $15^\circ\text{C}$ ) بتدریج گرم شد ( $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ ). هنگامی که قطرات رنگی شروع به حرکت در ژل نمودند به عنوان نقطه ذوب در نظر گرفته شد [۸].

## ۲-۵-۵- ویسکوزیته ژلاتین

به منظور تعیین ویسکوزیته ژلاتین از ویسکومتر جریان موئینه کانون-فنسک (Cannon Instrument Co., State College, PA, USA) استفاده شد. روش کار در ویسکومتر جریان موئینه بدین صورت است که زمان مورد نیاز برای عبور حجم استاندارد از سیال داخل لوله موئینه‌ای با طول معلوم اندازه‌گیری می‌گردد. بدین منظور غلظت‌های متفاوتی از ژلاتین (۰/۵ تا ۳ g/l) توسط آب مقطر تهیه گردید (طبق مطالعات پیشین دانسیته محلول ۳/۳٪ ژلاتین  $1.020 \text{ g/cm}^3$  تعیین شد). ویسکوزیته ژلاتین در دامنه دمایی  $30^\circ\text{C}$  تا  $50^\circ\text{C}$  با فواصل  $10^\circ\text{C}$  تعیین شد. سیال مرجع مورد استفاده در این پژوهش آب مقطر بود. سپس ویسکوزیته نمونه توسط معادلات زیر محاسبه گردید.

(۲)

$$v = \frac{\mu}{\rho} = \alpha t$$

(۳)

$$\mu = v \times \rho = v \times 1.02$$

در این معادلات،  $\alpha$  ثابت کالیبراسیون ویسکومتر،  $\mu$  ویسکوزیته مطلق (mPa.s)،  $t$  زمان ریزش یا جاری شدن (s)،  $\rho$  چگالی نمونه ( $\text{kgm}^{-3}$ ) و  $v$  ویسکوزیته سینماتیک ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) است [۹].

## ۲-۵-۱- تابعیت ویسکوزیته با دما

بلو R-250، انجام گرفت. ژل الکتروفورز از نوع عمودی بوده و از مارکر واید<sup>۳</sup> (Fermentas Company, Germany) به عنوان پروتئین استاندارد برای شناسایی زنجیره‌های پروتئینی استفاده شد. با این مارکر می‌توان زنجیره‌هایی با وزن مولکولی تا ۲۰۰ کیلوالتون را از هم شناسایی کرد [۱۰].

## ۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

### ۲-۷-۱- تجزیه و تحلیل آماری و تیمارها

آنالیز آماری با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۹۵ درصد انجام گرفت. جهت آنالیز آماری از نرم افزار Statistix نسخه ۸ استفاده گردید. تیمارهای مورد بررسی شامل روش استخراج (روش‌های I, II, III و IV)، دما (۳۰ تا ۵۰ °C) و غلظت ژلاتین (۰/۵ تا ۳) بود (لازم به ذکر است که تیمارهای دما و غلظت بکار رفته در این پژوهش فقط به منظور بررسی تابعیت ویسکوزیته ژلاتین استحصالی بر حسب دما و غلظت است). تیمارهای استفاده شده برای استخراج ژلاتین به شرح ذیل انتخاب شد.

- روش I: استخراج ژلاتین با ترکیبی از محلول‌های دوگانه اسید استیک ۰/۲ نرمال و هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال در شرایط دمایی ارائه شده در بخش ۲-۲.

- روش II: استخراج ژلاتین با ترکیبی از محلول‌های دوگانه اسید استیک ۰/۲ نرمال و هیدروکسید سدیم ۲ نرمال در شرایط دمایی ارائه شده در بخش ۲-۲.

- روش III: استخراج ژلاتین با ترکیبی از محلول‌های دوگانه اسید استیک ۲ نرمال و هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال در شرایط دمایی ارائه شده در بخش ۲-۲.

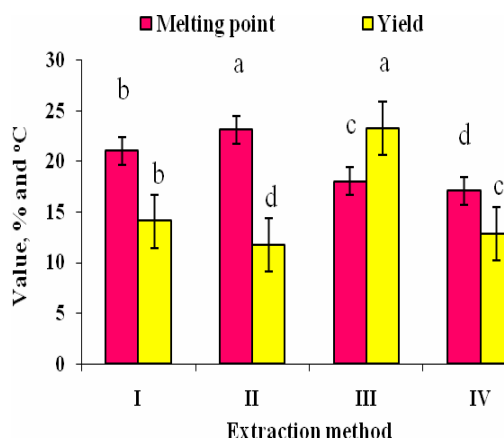
- روش IV: استخراج ژلاتین با ترکیبی از محلول‌های دوگانه اسید استیک ۲ نرمال و هیدروکسید سدیم ۲ نرمال در شرایط دمایی ارائه شده در بخش ۲-۲.

از این ژل استفاده شد) استفاده گردید. چون پروتئین‌ها دارای بارهای مختلفی هستند، به بافر ماده شیمیایی سدیم دو سولفات (مولکول بزرگ با بار منفی است و این ماده باعث واسرشت شدن پروتئین‌ها شده و به آنها متصل می‌شود) برای اینکه تفکیک فقط براساس وزن مولکولی انجام شود، اضافه شد. ژلاتین استخراجی پس از تعیین مقدار حجم و درصد پروتئین آن مورد دیالیز قرار گرفت. دیالیز با استفاده از کیسه دیالیز (شرکت Micro pore، آمریکا) با اندازه منافذ ۱۲ KDa انجام شد. عمل دیالیز محلول ژلاتین به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در داخل آب مقطر انجام گردید. هدف از انجام این کار حذف بیشتر ترکیبات غیرپروتئینی و همچنین جدا کردن پروتئین‌ها با اوزان مولکولی بیشتر از ۱۲ کیلوالتون و نیز ایجاد باندهای واضح در الکتروفورگرام ژلاتین‌های استخراجی بود. در واقع عمل جداسازی ترکیبات غیرپروتئینی و ناخالص نظیر املاح از طریق جداسازی یونی نفوذ پذیر انتخابی کیسه دیالیز به کمک عمل اسمز در محیط آبی انجام گردید. به منظور کمک به ایجاد حالت یکنواخت و تسهیل اسمز، در داخل بشر یک عدد قرص مگنت قرار داده شد و بشر روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفت. به منظور نتیجه‌گیری بهتر و داشتن باندهای واضح، پس از گذشت ۶-۷ ساعت دیالیز آب بشر با آب تازه تعویض شد (آب تازه قدرت تبادل یونی بالاتری داشته و به خالص‌سازی<sup>۲</sup> بهتر نمونه ژلاتین کمک نموده و نیز سرعت انتشار را افزایش می‌دهد). پس از اتمام عمل دیالیز، ژلاتین دیالیز شده از کیسه خارج و عملیات رقیق‌سازی روی آن انجام گرفت و غلظت پروتئین تا غلظت ۲ mg/μl تنظیم گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از این محلول با ۵۰ میکرولیتر بافر مخلوط و به عنوان نمونه الکتروفورز تا زمان آزمون در فریزر نگهداری شد. سپس مقادیر مساوی از پروتئین به مدت ۳ ساعت در داخل چاهک دستگاه به منظور پخش بارگذاری شد (ولتاژ دستگاه روی ۱۰۰ ولت تنظیم شد). بعد از الکتروفورز، عملیات رنگ آمیزی توسط رنگ کوماسی برلیان

## ۳- نتایج و بحث

ترکیبات پروتئینی بیشتری استخراج گردیده و راندمان استخراج بالا رفته، اما افزایش غلظت قلیا راندمان را کاهش می دهد. بطور کلی با افزایش غلظت اسید، میزان شکسته شدن پیوند های پپتیدی بیشتر شده و ترکیبات پروتئینی راحت تر از پوست جدا و وارد فاز محلول گردید. طوری که در این پروژة بهترین شرایط راندمان استحصال پروتئین، استفاده از قلیای ضعیف و اسید قوی می باشد. اندو<sup>۴</sup> علت این امر را هیدرولیز قوی عامل بازی با پروتئین ها می داند [۱۳]. قلیا، اسید آمینه های محلول را در خود حل نموده و از این طریق به خالص سازی ژلاتین کمک می نماید.

نتایج تأثیر روش استخراج (I, II, III و IV) بر روی ویسکوزیته<sup>۵</sup> مطلق ژلاتین استحصالی در شکل ۳ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می گردد بیشترین ویسکوزیته ژلاتین در روش (III) مشاهده شد.

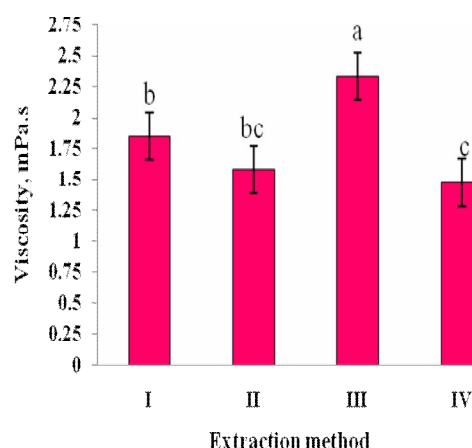


**Fig 2** The effect of different extraction Methods (I, II, III & IV) on yield and the melting point of extracted gelatin. Method I: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method II: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method III: 2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide and Method IV: 2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide. The different letters indicate significant differences between means ( $p < 0.05$ ).

خصوصیات فیزیکی ژلاتین استحصالی: نتایج مقایسه میانگین نشان داد که روش استخراج تأثیر معنی دار و چشمگیری ( $p < 0.05$ ) بر روی نقطه ذوب و بازده استخراج ژلاتین داشت (شکل ۱). نقطه ذوب یک محلول ژلاتینی به عوامل مختلفی نظیر نوع ماهی (گرم ابی و سرد ابی بودن آن) و درصد پروتئین های استحصالی و نوع تیمار های عمل اوری کننده و ماهیت اسید آمینه های استحصالی در محلول ژلاتین و... بستگی دارد [۱۱]. در مقایسه میانگین نمونه های ژلاتینی، بیشترین نقطه ذوب در تیمار با درصد قلیا بالا و اسید پایین مشاهده شد (شکل ۱). به طور کلی، ژلاتین فرایند قلیایی دارای میزان هیدروکسی پرولین بالاتر و تیروزین پایین تری نسبت به فرایند اسیدی است که البته این امر به نوع ماده اولیه بستگی دارد. ژلاتین فرایند اسیدی دارای خلوص و شفافیت بالایی بوده و در طی فرایند مقدار پپتید بیشتری از میزان هیدروکسی پرولین و نیز مقدار کمتری از پپتید های تیروزین را از دست می دهد [۱۲]. بیشترین نقطه ذوب ژلاتین استحصال شده در روش استخراج (II) مشاهده شد. نقطه ذوب ژلاتین استحصال شده با روش (II) نسبت به روش های (I), (III) و (IV) به ترتیب ۸/۸۹، ۲۱/۹۰ و ۲۶/۰۳٪ بیشتر بود. در مورد بازده استخراج، بیشترین مقدار با اختلاف معنی دار ( $p < 0.05$ ) در روش استخراج (III) مشاهده شد (۲۳/۲۴ درصد). نتایج نشان داد که بازده استخراج ژلاتین با بکارگیری مقادیر بالاتر اسید استیک (روش های III و IV)، افزایش و با مقادیر کمتر آن (یعنی در روش های I و II)، کاهش می یابد. همچنین افزایش مقدار هیدروکسید سدیم منجر به کاهش بازده استخراج شد (روش های II و IV). بنابراین می توان چنین ارزیابی نمود که غلظت هیدروکسید سدیم، نقش بحرانی در تعیین بازده استخراج ژلاتین ایفا می نماید. همان طور که مشخص است با افزایش غلظت اسید میزان تخریب پیوند های متقاطع کلاژنی بیشتر شده،

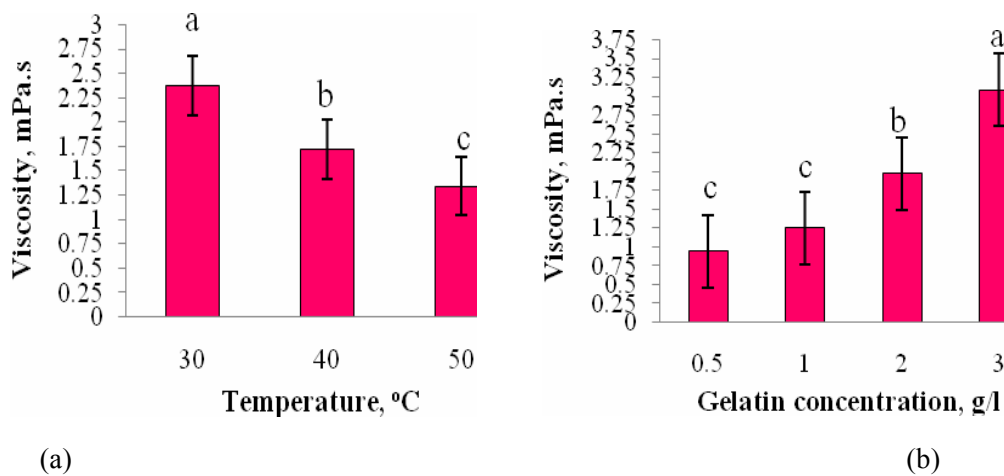
4. Ando

(غلظت ۲ نرمال)، افزایش غلظت اسید استیک از ۰/۲ به ۲ نرمال، ویسکوزیته مطلق ژلاتین را ۶/۹۶٪ کاهش داد. این نتایج نشان می‌دهد تأثیر افزایش/کاهش ویسکوزیته مطلق ژلاتین با افزایش غلظت اسید استیک، کاملاً به غلظت هیدروکسید سدیم وابسته بوده و در غلظت کم هیدروکسید سدیم (۰/۲ نرمال)، اثر هم‌افزایی (سینرژیستی) دو ترکیب بر روی ویسکوزیته ژلاتین به شکل بارزتری مشاهده می‌شود. تأثیر افزایش دما بر روی ویسکوزیته مطلق محلول ژلاتین نشان داد که، افزایش دمای محلول از ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد، ویسکوزیته مطلق ژلاتین را ۴۳/۴۵٪ کاهش داد. در مایعات عامل اصلی ویسکوزیته پیوستگی بین مولکولی یا به بیان دیگر نیروی جاذبه بین مولکولی ذرات بوده که مانع حرکت آزاد آنها می‌شود. با افزایش دما فاصله بین مولکول‌ها افزایش یافته، بنابراین جاذبه بین مولکولی و در نهایت ویسکوزیته کاهش می‌یابد [۹]. همچنین افزایش غلظت محلول ژلاتین از ۰/۵ g/l به ۳ g/l سبب ۶۹/۴۸٪ افزایش در ویسکوزیته مطلق محلول ژلاتین شد (شکل ۴ ب). با افزایش غلظت اسید استیک (از ۰/۲ تا ۲ نرمال) در غلظت ثابت هیدروکسید سدیم (۰/۲ نرمال)، میزان زنجیره‌ها با وزن مولکولی بالا افزایش یافت (روش III) که این امر، بالاتر بودن ویسکوزیته مطلق ژلاتین استحصالی با این روش را تأیید می‌نماید. باندهای با وزن مولکولی بالاتر (باند آلفا ۱) در روش استخراج (III) نسبت به سایر روش‌های استخراج نمود بیشتری داشت. در این روش استخراج، زنجیره‌های بتا در محدوده ۱۷۰-۱۵۰ کیلوالتون مشاهده شد. در روش استخراج (II)، باندهای با وزن مولکولی بالاتر، به شکل کم رنگ‌تر دیده می‌شود. مقدار ویسکوزیته در این روش استخراج (II) نسبتاً پایین بوده که حضور زنجیره‌های با وزن مولکولی پایین، این امر را تأیید می‌نماید. همچنین بررسی مقادیر انرژی فعال‌سازی در روش‌های استخراج مختلف نشان داد که بیشترین انرژی فعال‌سازی در روش استخراج (III) مشاهده شد که علت آن به دلیل بالاتر بودن ویسکوزیته ژلاتین استحصالی می‌باشد (شکل ۳).

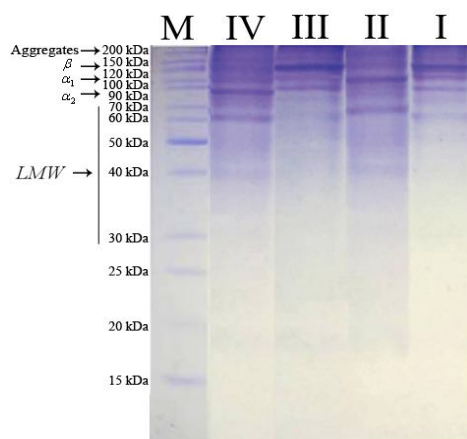


**Fig 3** The effect of different extraction Methods (I, II, III & IV) on the viscosity of extracted gelatin. Method I: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method II: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method III: 2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide and Method IV: 2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide. The different letters indicate significant differences between means ( $p < 0.05$ ).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تأثیر دما و غلظت محلول ژلاتین بر روی ویسکوزیته مطلق معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) می‌باشد (شکل ۴ الف و ب). ویسکوزیته ژلاتین عموماً توسط ویسکومتر لوله موئین، ویسکومترهای بوهلین و بروکفیلد اندازه‌گیری می‌شود. ژلاتین با ویسکوزیته پایین (یا قدرت ژل بالا) در صنایع قنادی کاربرد دارد. و ژلاتین با گرانیوی بالا (قدرت ژل پایین) در تشکیل فیلم‌های ژلاتینی کاربرد وسیعی دارد. ویسکوزیته ژلاتین عمدتاً از روی زمان جریان یافتن محلول ژلاتین از میان پیپت کالیبره شده ویسکوزیته محاسبه می‌شود [۱۴]. به طور کلی روند تغییرات ویسکوزیته مطلق در روش‌های مختلف استخراج از روندی مشابه با "بازده استخراج ژلاتین" تبعیت می‌نماید. به بیان دیگر ویسکوزیته مطلق ژلاتین با بکارگیری مقادیر بالاتر هیدروکسید سدیم (روش‌های II و IV)، کاهش و با مقادیر کمتر آن (روش‌های I و III)، افزایش می‌یابد. در روش‌های (I) و (III)، در غلظت برابر هیدروکسید سدیم (غلظت ۰/۲ نرمال)، افزایش غلظت اسید استیک از ۰/۲ به ۲ نرمال، ویسکوزیته مطلق ژلاتین را ۲۰/۶٪ افزایش داد در حالی که در روش‌های استخراج (II) و (IV)، در غلظت برابر هیدروکسید سدیم



**Fig 4** The effect of temperature (a) and concentration (b) on the viscosity of gelatin. Method I:  $0.2^N$  acetic acid+ $0.2^N$  sodium hydroxide, Method II:  $0.2^N$  acetic acid+ $2^N$  sodium hydroxide, Method III:  $2^N$  acetic acid+ $0.2^N$  sodium hydroxide and Method IV:  $2^N$  acetic acid+ $2^N$  sodium hydroxide. The different letters indicate significant differences between means ( $p < 0.05$ ).



**Fig 5** SDS-PAGE patterns of gelatin extracted from the skin of Caspian Sea *Huso huso* for different extraction methods (I, II, III & IV), M: Marker. Method I:  $0.2^N$  acetic acid+ $0.2^N$  sodium hydroxide, Method II:  $0.2^N$  acetic acid+ $2^N$  sodium hydroxide, Method III:  $2^N$  acetic acid+ $0.2^N$  sodium hydroxide and Method IV:  $2^N$  acetic acid+ $2^N$  sodium hydroxide.

همچنین بررسی مقادیر انرژی فعالسازی در روشهای استخراج مختلف نشان داد که بیشترین انرژی فعالسازی در روش استخراج (III) مشاهده شد که علت آن به دلیل بالاتر بودن ویسکوزیته ژلاتین استحصالی می باشد (شکل ۳).

الکتروفورگرام ژلاتین فیل ماهی در شکل ۵ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می گردد. در تمامی روشهای مختلف استخراج زنجیره های آلفا ۱ و ۲ مشاهده می گردد و در وزن مولکولی ۹۰ کیلو دالتون در تمامی روشهای استخراج باندهای واضح مشاهده شد. بالا بودن نقطه ذوب ژلاتین با وزن زنجیره های مولکولی در ارتباط است بطوری که در نمونه ها با نقطه ذوب بالا، زنجیره های آلفا ۱ و ۲ بیشتری مشاهده می گردد. البته حضور مقدار بالای باندهای آلفا، افزایش نقطه ذوب را در این روش نسبت به سایر روشهای استخراج تأیید می نماید.

برای تعیین تابعیت ویسکوزیته مطلق ژلاتین با درجه حرارت از مدل آرنیوس (معادله ۵) استفاده گردید و با استفاده از رگرسیون خطی ضریب پیش نمایی ( $\mu$ ) و انرژی فعالسازی ( $E_a$ ) محاسبه شد که مقادیر آنها در غلظت های مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود با افزایش غلظت ژلاتین (در یک روش استخراج مشخص) انرژی فعالسازی افزایش می یابد که مطابق با انتظار است.



**Table 1.** Parameters of the Arrhenius function for describing the temperature dependency of viscosity.

Extraction method*	Gelatin concentration, g/l / Arrhenius model parameters											
	0.5			1			2			3		
	$\mu_{o,T}$	$E_{a,s}$ kJ/mol	$R^2$	$\mu_{o,T}$	$E_{a,s}$ kJ/mol	$R^2$	$\mu_{o,T}$	$E_{a,s}$ kJ/mol	$R^2$	$\mu_{o,T}$	$E_{a,s}$ kJ/mol	$R^2$
Method I	0.0014	17.01	0.999	0.0010	18.40	0.996	0.0017	18.31	0.994	0.0008	21.34	0.981
Method II	0.0017	16.31	0.998	0.0007	19.16	0.997	0.0003	22.58	1.00	0.0002	24.83	0.999
Method III	0.0003	21.17	0.997	0.0005	20.86	0.999	$5 \times 10^{-5}$	28.24	0.993	$1 \times 10^{-5}$	32.66	0.996
Method IV	0.0015	16.38	0.998	0.0004	20.51	0.992	0.0002	23.28	0.999	0.0003	23.34	0.997

\*Method I: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method II: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method III: 2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide and Method IV: 2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide.

و ۳ ارائه شد. نتایج نشان داد که مدل نمایی، پارامترهای رئولوژیکی ژلاتین را با دقت بالاتری پیش‌بینی نمود ( $R^2 > 0.992$ ).

برای تعیین وابستگی ویسکوزیته مطلق با غلظت (بریکس) ژلاتین از دو مدل نمایی و توانی (روابط ۶ و ۷) استفاده گردید. با گرفتن لگاریتم طبیعی از طرفین روابط فوق و استفاده از رگرسیون خطی، پارامترهای مدل (B و  $\mu_{o,T}$ ) محاسبه و نتایج در جداول ۲

**Table 2.** The effect of gelatin concentration on the viscosity of Caspian Sea *Huso huso* gelatin based on exponential-type model [ $\mu = \mu_1 \exp(B_1 C)$ ].

Extraction method*	Temperature, °C / model parameters								
	30			40			50		
	$\mu_1^{**}$	$B_1$ , l/g	$R^2$	$\mu_1$	$B_1$ , l/g	$R^2$	$\mu_1$	$B_1$ , l/g	$R^2$
Method I	0.9631	0.4807	0.997	0.7930	0.4807	0.998	0.6448	0.4440	0.997
Method II	0.8858	0.4531	0.997	0.7339	0.4059	0.994	0.6079	0.3713	0.998
Method III	1.0227	0.6031	0.996	0.8361	0.5141	0.997	0.6645	0.4793	0.992
Method IV	0.8226	0.4572	0.994	0.6516	0.4238	0.999	0.5465	0.3934	0.997

\*Method I: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method II: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method III: 2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide and Method IV: 2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide. (\*\*) $\mu_1$  in mPa.s.

**Table 3** The effect of gelatin concentration on the viscosity of Caspian Sea *Huso huso* gelatin based on power-type model [ $\mu = \mu_2 C^{B_2}$ ].

Extraction method*	Temperature, °C / model parameters								
	30			40			50		
	$\mu_2^{**}$	$B_2$ , l/g	$R^2$	$\mu_2$	$B_2$ , l/g	$R^2$	$\mu_2$	$B_2$ , l/g	$R^2$
Method I	1.7538	0.6615	0.955	1.3680	0.6020	0.957	1.1210	0.6131	0.962
Method II	1.5577	0.6257	0.962	1.2160	0.5629	0.967	0.9665	0.5091	0.950
Method III	2.1676	0.8332	0.962	1.5865	0.7094	0.961	1.2049	0.6692	0.978
Method IV	1.4527	0.6345	0.969	1.1061	0.5814	0.951	0.8938	0.5359	0.936

\*Method I: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method II: 0.2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide, Method III: 2<sup>N</sup> acetic acid+0.2<sup>N</sup> sodium hydroxide and Method IV: 2<sup>N</sup> acetic acid+2<sup>N</sup> sodium hydroxide. (\*\*) $\mu_2$  in mPa.s.

## ۴- نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر مشخص نمود که بیشترین بازده استخراج و ویسکوزیته مطلق ژلاتین در روش استخراج (III) مشاهده شد که علت آن به دلیل بالاتر بودن وزن مولکولی ژلاتین استحصالی بوده که این مطلب توسط الگوی الکتروفورز تایید گردید. نتایج مدلسازی تابعیت ویسکوزیته مطلق ژلاتین با غلظت نشان داد که هر دو مدل توانی و نمایی از دقت بالایی در پیش‌بینی برخوردار بودند. با این وجود نتایج نشان داد که مدل نمایی توانست پارامترهای رئولوژیکی ژلاتین را با ضریب تبیین بالاتر از ۰/۹۹۲ پیش‌بینی نماید. تابعیت ویسکوزیته مطلق ژلاتین با دمای مطلق با دقت خوبی از رابطه آرنیوس تبعیت نمود. بررسی مقادیر انرژی فعال‌سازی در روش‌های استخراج مختلف نشان داد که بیشترین انرژی فعال‌سازی در روش استخراج (III) مشاهده شد که علت آن به دلیل بالاتر بودن ویسکوزیته ژلاتین استحصالی می‌باشد.

## ۵- منابع

- Properties of Pigskin Gelatin. *Procedia Food Science*. 3, 383-388.
- [6] 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.
- [7] Mahjoorian, A., Mortazavi, S. A., Tavakolipour, H., Motamedzadegan, A., & Askari, B. 2013. Rheological properties of skin gelatin of Beluga Sturgeon (*Huso huso*) from The Caspian Sea. *Annals of Biological Research*. 4,7, 227-234.
- [8] Zhou, P. and Regenstein, J.M., 2005. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of Food Science*. 70,6, 392-396.
- [9] Mokhtarian, M., Tavakolipour, H., Jafari Savareh, S. and Amiri, M. 2013. Determination of optimal parameters to extraction and formulation of functional drink from green tea and determining its physicochemical and rheological properties. *Research and Innovation in Food Science*. 3,1, 295-310.
- [10] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 227,5259, 680-685.
- [11] Yang, H., Wang, Y., Zhou, P. and Regenstein, J. M. 2008. Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. *Food Hydrocolloids*. 22, 1541-1550.
- [12] Ward, A. G. and Courts, A. 1977. The science and technology of gelatin. Academic press. London.
- [13] Ando, M., Toyohara, H. and Sakaguchi, M. 1992. Three dimensional structure of collagen fibrillar network of pericellular connective tissue in association with firmness of fish muscle. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 58, 1361-1364.
- [14] Cole, C.G.B. 2000. Gelatin. *Encyclopedia of food science and technology*. 4,1183-1188.
- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Abromand, A. 1989. Gelatin production from fishery wastage. M.Sc thesis, Food Science and Technology, Tarbiat Modares University. page 250.
- [4] Badii, F. and Howell, N.K. 2006. Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*. 20,5, 630-640.
- [5] Sompie, M., Surtijono, S. E., Pontoh, J. H. W. and Lontaan, N. N. 2015. The Effects of Acetic Acid Concentration and Extraction Temperature on Physical and Chemical

## The extraction of gelatin from Caspian Sea (*Huso Huso*) skin and survey its rheological properties

Mahjoorian, A.<sup>1\*</sup>, Norouzi, M. , Mokhtarian, M.<sup>2</sup>

1. Young Researchers and Elite Club, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2. Department of Chemistry, Payam Noor university, P.O. Box 19395-3697, Tehran, Iran
3. Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

(Received: 2016/02/21 Accepted: 2018/12/28)

Gelatin is one colloidal protein that it used the most widely in the food, pharmaceutical, medical and military industry. Annually, considerable amounts of gelatin for different uses were transferred into the country. In other hand, the Caspian Sea is the rich sources of fishes such as Beluga sturgeon, carp, Caspian White fish and etc, that significant amounts of residue which is lost as waste that can be a good source to extract gelatin. In this study the effect of different extraction methods gelatin (I, II, III and IV) of beluga skin was examined. Results showed that the highest melting point, yield and absolute viscosity gelatin extracted were observed in II, III and III methods, respectively. The gelatin viscosity decrease with increasing concentration of sodium hydroxide (method II and IV), and with smaller amounts of (Methods I and III), increases. Also, using the Arrhenius equation to determine the relation between viscosity gelatin and temperature were used, then activation energy calculated in the range 16.31 to 32.66 kJ / mol respectively. Finally, using exponential and power models viscosity gelatin was fitted with Brix. Modeling results indicated that the exponential model was more accurate in predicting the gelatin absolute viscosity.

**Keywords:** Gelatin, Beluga Sturgeon, Melting point, Extraction yield, Rheological properties.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: pnamari@gmail.com