



استخراج ژلاتین به کمک آبکافت آنزیمی از پوست ماهی هوور (*Thunnus tonggol*)

پریسا فیضی^۱، علیرضا سالارزاده^{۱*}

۱-دکترای فناوری مواد غذایی دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

*۲-دانشیار گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۳/۱۹	ژلاتین یک ترکیب پروتئینی قابل حل در آب است که توسط هیدرولیز جزئی از کلاژن به دست می آید و کاربردهای بسیاری در صنایع غذایی و علوم تغذیه دارد. بنابراین پژوهش حال حاضر در رابطه با استخراج ژلاتین از منابع ارزان و در دسترس انجام شد. در این مطالعه 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 و وزنی-وزنی و pH در سه سطح ۲، ۳ و ۴ بر روی استخراج ژلاتین از پوست ماهی هوور بررسی گردید. در این راستا استحکام ژل، بازده و رنگ پودر ژلاتین های استخراج شده اندازه گیری شد. نتایج نشان داد با افزایش pH و درصد آنزیم، استحکام ژل افزایش یافت ($P < 0/05$) اما دما اثر معنی داری بر آن نداشت ($P > 0/05$). بیشترین استحکام ژل مربوط به تیمار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و درصد آنزیم ۰/۱ وزنی-وزنی و $pH = 4$ مشاهده شد. بررسی رنگ ژلاتین نشان داد که میزان روشنایی (L^*)، قرمزی (a^*) و سفیدی (W) در پودر ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی بیشتر از روش شیمیایی بوده ($P < 0/05$) اما میزان شاخص رنگ زرد (b^*) در استخراج به روش شیمیایی نسبت به روش آنزیمی افزایش یافت ($P < 0/05$). بیشترین روشنایی در ژلاتین استخراج شده با شرایط دمایی ۴۰ درجه سانتی گراد، درصد آنزیم ۰/۰۵۵ وزنی-وزنی و $pH = 3$ 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 $pH = 2$ 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 $pH = 4$ منجر به بازدهی بیشتر ولی استفاده از دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم ۰/۰۱ و $pH = 2$ منجر به تولید ژلاتین با استحکام ژل بیشتر می شود.
کلمات کلیدی: استخراج آنزیمی، ژلاتین، استحکام ژل، رنگ، بازده.	
DOI: 10.22034/FSCT.22.166.56. * مسئول مکاتبات: Reza1375bandar@yahoo.com	

۱-مقدمه

ژلاتین یک ترکیب پروتئینی قابل حل در آب است که توسط هیدرولیز جزئی از کلاژن به دست می‌آید و پروتئین رشته‌ای اصلی در استخوان‌ها، غضروف و پوست را تشکیل می‌دهد، درواقع منبع، سن حیوان و نوع کلاژن عوامل مؤثر بر خواص ژلاتین می‌باشند [۱]. ژلاتین به‌طور گسترده در بسیاری از زمینه‌های صنعتی قابل‌استفاده است ازجمله غذا، دارو، عکاسی [۲] و به جهت خواص بی‌نظیر شیمیایی و فیزیکی کاربرد گسترده‌تری در صنایع غذایی و دارویی دارد [۳]. قابلیت تولید ژل، خاصیت چسبندگی، شفاف‌کنندگی و قوام‌دهندگی را نیز دارا است [۴]. تاریخچه تولید ژلاتین در امریکا به سال ۱۸۵۰ برمی‌گردد. پس‌ازآنکه در سال ۱۹۳۰ پوست خوک نیز جزء مواد اولیه به کار گرفته شد، رشد چشم‌گیری پیدا نمود. این صنعت از سال ۱۹۹۶ در اروپا رونق یافت. تهیه ژلاتین از پوست ماهی در سطح جهانی در بندر ساکسون اسکاتلند انجام می‌گرفت [۵]. اولین شرکت تولیدی ژلاتین در انگلستان در سال ۱۷۴۵ تأسیس و ژلاتین عاری از افزودنی‌ها و نگه‌دارنده‌ها به بازار عرضه شد. ژلاتین تهیه‌شده از رشته‌های کلاژن، قابل‌هضم، بدون کلسترول، چربی و کربوهیدرات است که اثرات مثبت ویژه‌ای بر سلامت انسان دارد. ژلاتین یک پروتئین منحصربه‌فرد با توجه به هر دو توانایی خود به شکل ژل حرارتی برگشت‌پذیر با دمای ذوب نزدیک به دمای بدن است که در آب قابل حل است. باوجود خواص منحصربه‌فرد ژلاتین، طیف گسترده‌ای از قابلیت‌های بالقوه آن به دلیل ساختار خاص آن‌که متشکل از ۲۰ اسیدهای آمینه است، می‌باشد [۶]. ژلاتین یکی از پرکاربردترین هیدروکلوئیدها در صنایع مختلف است. مصارف خوراکی عمده ژلاتین در محصولات نانوایی (برای امولسیون سازی، ایجاد ژل و پایداری)، صنایع لبنی (برای ایجاد پایداری و بهبود بافت)، شیرینی‌پزی (برای پایداری کف و بهبود بافت)، تولید محصولات رژیمی (برای ایجاد حالت خامه‌ای، کاهش میزان چربی، و بهبود احساس دهانی)، و در صنایع گوشتی (برای جلوگیری از آب انداختن

محصول) بوده و علاوه بر آن در صنایع آرایشی و بهداشتی، دارویی و شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۶]. ژلاتین ماهی با ژلاتین پستانداران در خواصی از قبیل دمای ژله‌ای شدن، ذوب و قدرت ژل متفاوت است. علت این تفاوت ترکیب‌های مختلف اسیدآمینه به‌خصوص پرولین و هیدروکسی پرولین است. هیدروکسی پرولین آمینواسیدی است که از پرولین مشتق شده است. هر دو آن‌ها مسئول ثبات و پایداری ساختار کلاژن می‌باشند. آن‌ها پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند که ساختار مارپیچی سه‌گانه (triple-helix) را توسط پیچش شدید ساختار کلاژن پایدار می‌سازد. حضور پرولین و هیدروکسی پرولین هم‌چنین مسئول ذوب و دمای بسته شدن ژل در انواع مختلف ژلاتین است. محتوای این اسیدهای آمینه در انواع مختلفی از منابع ژلاتین متفاوت است. پرولین و هیدروکسی پرولین کمتر باعث کاهش نقطه ذوب و دمای بسته شدن ژل در ژلاتین می‌شود [۶]. اگرچه ژلاتین دام به اشکال مختلف و در ابعاد وسیع مصرف جهانی دارد، اما بدبینی و هشدارهای جدی برای مصرف ژلاتین دام وجود دارد [۷]. این امر اغلب به دلیل عقاید مذهبی (ممنوعیت مصرف هرگونه فرآورده مرتبط با گاو نزد هندوها و خوک در اسلام و یهودیت) و نیز تبعیت شدید از گیاه‌خواری در سراسر جهان است. هم‌چنین هشدارها در بین محققان در حال افزایش است که عوامل بیماری‌زا مانند وکتورها قابل‌انتقال هستند [۸]. تحقیقات بیشتر در این خصوص نشان می‌دهند که ژلاتین دام مستقیماً با ظهور بیماری جنون گاوی یا (Bovine BSE Spongiform Encephalopathy) در اروپا مرتبط است. بنابراین تلاش برای یافتن جایگزین‌های مناسب ژلاتین برای محصولات غذایی در حال افزایش است. ژلاتین ماهی خصوصاً با داشتن خصوصیتی مانند دمای ذوب پایین‌تر، حل شدن سریع در دهان و عدم ایجاد حالت لاستیکی یکی از مناسب‌ترین جایگزین‌های ژلاتین پستانداران محسوب شده و به‌عنوان غذایی حلال پذیرفته می‌باشد. اگرچه تولید ژلاتین ماهی در مراحل ابتدایی توسعه خود قرار دارد و تنها حدود ۱٪ تولید سالیانه را در برمی‌گیرد. اما میزان ضایعات سالیانه

و خرگوش [۲۳] جدا شده و مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه مت مارو و همکاران (۲۰۱۱)، خصوصیات کلاژن محلول در اسید (ASC) و کلاژن محلول در پیپسین (PSC) تهیه شده از بز ماهی طلائی خالدار (*Parupeneus heptacanthus*) بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که هم ASC و PSC به عنوان کلاژن نوع I، حاوی زنجیره $\alpha 1$ و $\alpha 2$ مشخص شدند. همچنین در هر دو کلاژن ترکیبات β و γ یافت شد. بر اساس طیف FTIR، هضم محدود توسط پیپسین ساختار ماریپچ سه گانه کلاژن را مختل نکرد. فنگ و همکاران (۲۰۱۳)، بهینه سازی استخراج و خصوصیات کلاژن تهیه شده از پوست ماهی خاویار چینی (*Acipenser sturio* Linnaeus) به کمک آنزیم را بررسی کردند 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 پیپسین بر ساختار ثانویه کلاژن، به ویژه ساختار سه بعدی، تأثیر نمی گذارد.

بر اساس مجموعه مطالعات صورت گرفته، تاکنون مطالعه ای در زمینه استخراج ژلاتین از پوست ماهی هوور با استفاده از روش آنزیمی به کمک آنزیم پیپسین و بررسی ویژگی های عملکردی آن و اثر آنزیم بر بهبود خواص بافتی ژلاتین صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق ویژگی های عملکردی و اثر آنزیم بر ژلاتین استخراج شده با استفاده از تکنیک استخراج آنزیمی به کمک آنزیم پیپسین مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد مصرفی و تجهیزات

سدیم کلرید، آنزیم پیپسین (TITRACHEM ساخت ایران)، سدیم کربنات، هیدروکلریک اسید ۳۷٪، سدیم هیدروکسید (Merck آلمان)، سایر مواد آزمایشگاهی

حاصل از فراوری ماهی حدود ۷-۳ میلیون تن بوده که می تواند به عنوان منبع غنی و ارزشمندی برای تولید ژلاتین ماهی مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از این ضایعات سبب کاهش هزینه های دفع و از بین بردن ضایعات کارخانه های فراوری ماهی و ایجاد ارزش اقتصادی برای آن ها می شود [۹]. ژلاتین ماهی دمای تشکیل ژل و ذوب پایینی دارد که کاربرد صنعتی آن را محدود می کند؛ با این وجود خواص کاربردی ژلاتین را می توان از نظر شیمیایی و آنزیمی بهبود داد [۶]. کیفیت ژلاتین و کلاژن وابسته به ویژگی های فیزیکی، شیمیایی، رئولوژیکی، و شرایط استخراج مناسب و نوع منبع آن ها است. مشخص شده است که از لحاظ تجاری ژلاتین ماهی به دلیل داشتن قدرت ژل و نقطه ذوب پایین تر، همچنین تشکیل ژل کند با ژلاتین پستانداران قابل رقابت نیست. برای برطرف کردن یا کاهش برخی از این مشکلات راه کارهایی مانند استفاده از آنزیم برای استخراج، ارائه شده است، که یکی از آن ها بهبود استحکام و خصوصیات ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی است [۱۰]. آنزیم پیپسین حیوانی که به نام $EC\ 3/4/23/2$ نیز شناخته می شود، یک پروتئاز اسیدی مهم است که به طور گسترده ای در هیدرولیز پروتئین ها استفاده می شود و جزء پروتئازهای آسپارتیکی مهم با بسیاری از ویژگی های منحصربه فرد در برنامه های کاربردی صنعتی و نیز در تحقیقات پزشکی استفاده می شود. pH بهینه از $4/0 - 2/0$ ، پایداری $pH \geq 6/0$ ، درجه مطلوب بهینه از $30 - 55$ درجه سانتی گراد و پایداری حرارتی ویژه $50 - 40$ درجه سانتی گراد است. دارای وزن مولکولی ۳۶ کیلو دالتون است. پیپسین در غشای معده سنتز و ترشح می شود. حالت غیرفعال پیپسین به نام پیپسینوژن (PG) (با وزن مولکولی ۴۰ کیلو دالتون) است [۱۱].

پیپسین در استخراج کلاژن [12,13,14] و استخراج ژلاتین [۱۵] و به عنوان جایگزین مایه پنیر [۱۶] بکار می رود. پیپسین در درجه اول در شیره معده قسمت لومن معده یافت می شود و سپس از پستانداران مختلف از جمله انسان [۱۷]، میمون ژاپنی [۱۸]، خوک [۱۹]، گاو [20,21]، موش [۲۲]

مورد استفاده با درجه آزمایشگاهی و خلوص بالا از فروشگاه‌های مواد شیمیایی و آزمایشگاهی معتبر تهیه شد.

۲-۲- آماده سازی نمونه

پوست ماهی هوور (*Thunnus tonggol*) از شرکت فرآورده های شیلانی بندرعباس واقع در شهرک صنعتی بندرعباس تهیه گردید و در یونولیت حاوی یخ به محل آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس انتقال داده شد. مواد زائد از پوست‌ها جدا و سپس با آب شسته و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته قبل از استخراج نگهداری شدند.

۲-۳- فرآیند پیش فرآوری

پیش تیمار سازی پوست به روش [۲۴] و استخراج به روش [۲۵] با اندکی تغییرات انجام شد. محلول ۳/۵٪ نمک طعام (NaCl)، جهت حذف پروتئین‌های غیرکلاژنی، و محلول ۰/۵٪ سدیم کربنات (Na_2CO_3)، جهت حذف چربی از پوست استفاده گردید. پیش فرآوری اولیه با محلول ۳/۵٪ سدیم کلرید به نسبت ۱:۱۰ وزنی-حجمی با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۶ ساعت به صورت مداوم با استفاده از شیکر اوربیتال (ساخت شرکت IKA، آلمان) هم زده شد و هر ۳ ساعت محلول تعویض شد. پس از شست و شو پوست‌ها با آب مقطر با نسبت ۱:۱۰ وزنی-حجمی با محلول ۰/۵٪ سدیم کربنات با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۶ ساعت به صورت مداوم هم زده شد و هر ۳ ساعت محلول عوض شد. سپس با آب مقطر شسته و فرآیند استخراج انجام شد.

۲-۴- نحوه‌ی استخراج

استخراج ژلاتین از پوست پیش تیمار یافته در آب مقطر به نسبت (۱:۲/۸) وزنی-حجمی در دماهای (۳۰، ۴۰ و ۵۰) درجه سانتی‌گراد و درصد آنزیم (۰/۰۱، ۰/۰۵۵ و ۰/۱) وزنی-وزنی و pH (۲، ۳ و ۴) به مدت ۶ ساعت و ۴۵ دقیقه در بن ماری (Fan azma gostar, Iran) انجام شد.

و به منظور تنظیم pH مناسب جهت فعالیت آنزیم در طول مدت استخراج هر ۳۰ دقیقه یکبار pH توسط pH متر (pH meter, CB 16 NW, U.K) اندازه‌گیری شد و برای رساندن آن به مقدار موردنظر از هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید ۱ نرمال استفاده شد. پس از پایان استخراج مخلوط در حمام آب جوش به مدت ۵ دقیقه برای غیرفعال کردن آنزیم‌ها قرار گرفت و در مرحله بعد محلول از پارچه تنظیف عبور یافته و سپس در سانتریفوژ (Santerifuge, Universal Santerifuge, Iran) با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه به منظور خالص سازی قرار داده شد و در نهایت به منظور خشک کردن مواد فیلتر شده و دستیابی به پودر خشک، از خشک کن انجمادی (Freeze Dryer, operon, FDU-8624, South Korea) استفاده شد. برای این منظور محلول ژلاتین در ظروف یکبارمصرف ریخته شد، ابتدا در قسمت فریزر یخچال معمولی در دمای ۱۸- قرار گرفت، بعد از منجمد شدن نمونه‌ها، در داخل اتاقک خشک کن انجمادی در دمای ۸۵- درجه سلسیوس قرار داده شدند تا فرآیند خشک شدن تحت خلأ را سپری نمایند. در نهایت پودر لیوفیلیزه شده که به عنوان ژلاتین پوست ماهی هوور هست، تهیه شد. پودرهای تولید شده در کیسه‌های زیپ دار در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان ارزیابی ویژگی‌های آن نگهداری شدند.

۲-۵- آزمون‌ها

۲-۵-۱- ارزیابی ویژگی های ژل

تعیین استحکام ژل: استحکام ژل به روش [۲۶] با اندکی تغییر با استفاده از دستگاه بافت سنج تعیین شد. برای اندازه‌گیری استحکام ژل ابتدا محلول ژلاتین ۳٪ وزنی-حجمی تهیه شد. بدین ترتیب که ۳ گرم پودر ژلاتین توسط ترازو آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱ (Laboratory balance with d= 0.0001, A & D GR200, Japan) وزن شده و به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده و در

در این پژوهش به منظور بهینه‌سازی تیمارهای آزمایشی از طرح آماری روش سطح پاسخ Response surface methodology (RSM) استفاده گردید. به منظور بهینه‌سازی فرآیند استخراج آنزیمی ژلاتین از طرح مرکب مرکزی (Central composite rotatable design) استفاده شد. بهینه‌سازی بر اساس قدرت ژل به عنوان شاخص در نظر گرفته شد و اثر متغیرهای مستقل شامل دما (°C 93.0، 40 و 50)، نسبت آنزیم (w/w 0.01، 0.05 و 0.1) و pH (2، 3 و 4) در 3 سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون آماری مدل به دست آمده برای هر پاسخ بر اساس آزمون آنالیز واریانس ANOVA صورت گرفت. جهت طراحی آزمایش، آنالیز نتایج، رسم نمودارها و بهینه‌سازی از نرم افزار دیزاین اکسپرت (نسخه 7) (Design Expert 7.00) استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه‌گیری استحکام ژل

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که میزان استحکام ژل بین ۴۸۳/۰۸ تا ۲۴۶۶/۳۶ گرم در تیمارهای مختلف متفاوت است. با توجه به جدول بیشترین میزان استحکام ژل مربوط به تیمار ۵ (۲۴۶۶/۳۶ گرم) می‌باشد. ساختار زنجیره α و β ژلاتین استخراج شده در این تیمار به دلیل بهینه بودن شرایط استخراج بیشتر حفظ شده و استحکام ژل افزایش یافته است، همچنین کمترین میزان استحکام مربوط به تیمار ۱۹ (۴۸۳/۰۸ گرم) به دلیل تخریب زیاد زنجیره‌های α و β می‌باشد.

دمای اتاق به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه به منظور آماس قرار گرفت، سپس در بن ماری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد حل شد کند. سپس نمونه‌های محلول ژلاتین ۳٪ در ظرف‌های پلاستیکی با قطر ۵/۵ و ارتفاع ۳ سانتیمتر ریخته شد نمونه‌ها به منظور طول دوره قوام ژل، به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. بجوم نمونه‌های ژل در شرایط دستگاهی، با پیستون استوانه‌ای با قطر ۱/۲۷ سانتی‌متر، بار سل ۱۰ کیلو نیوتون، سرعت نفوذ ۱ میلی‌متر بر ثانیه و عمق نفوذ ۱۰ میلی‌متر در ژل، اندازه‌گیری و ثبت شد و عدد بجوم از طریق معادله زیر محاسبه شد.

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

بازده ژلاتین: مقدار بازده ژلاتین استخراج شده مطابق روش [۲۷] از طریق معادله زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{وزن ژلاتین خشک شده}}{\text{وزن پوست اولیه}} = \text{بازده}$$

تعیین رنگ: اندازه‌گیری رنگ به روش [۲۸] با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج مدل (IMG-Pardazesh Cam- Systeme XI) با منبع نوری ۴۵ درجه و ناظر صفر درجه رنگ سنجی شد. برای اندازه‌گیری رنگ مقداری از نمونه ژلاتین خشک شده را در یک پلیت ریخته و در دستگاه به منظور اندازه‌گیری رنگ نمونه قرار می‌دهیم این اندازه‌گیری تحت عنوان اندازه‌گیری CIE L,a and b شناخته می‌شود، که در آن پارامترهای اندازه‌گیری شده عبارت‌اند از: L: روشنایی، a*: محور قرمز (+) تا سبز (-) و b*: محور زرد (+) تا آبی (-).

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

Table 1- The firmness and yield data related to the extracted gelatin from *Thunnus tonggol* skin by enzymatic method in RSM desing

Treatment	Temperature(°c)	Enzyme ratio (%)	pH	Firmness (g)	(%)Yield
۱	۴۰	۰/۱	۳	۱۰۷۹/۷	۱۷/۱±۶۵
۲	۳۰	۰/۰/۱	۲	۹۴۹/۲	۱۹/۱±۴۲۵
۳	۵۰	۰/۱	۴	۱۳۱۶/۴۸	۱۴/۱±۸
۴	۵۰	۰/۰/۵۵	۳	۹۶۳/۲۷	۱۸/۱±۰/۲۵
۵	۳۰	۰/۱	۴	۲۴۶۶/۳۶	±۴۵/۷
۶	۴۰	۰/۰/۵۵	۳	۵۰۳/۹	۱۸/۱±۱۲
۷	۵۰	۰/۰/۱	۴	۱۰۱۱/۹	۱۶/۱±۶۲۵
۸	۳۰	۰/۰/۱	۴	۱۰۵۱/۰/۵	۱۰/۱±۰/۵
۹	۴۰	۰/۰/۵۵	۳	۹۹۳/۵۵	۱۸/۱±۰/۱۲۵
۱۰	۴۰	۰/۰/۵۵	۲	۸۹۹/۶	۱۶/۱±۲۵
۱۱	۳۰	۰/۱	۲	۹۴۱/۴۲	۱۷/۱±۵۵
۱۲	۴۰	۰/۰/۵۵	۳	۸۸۹/۳	۱۸/۱±۹
۱۳	۴۰	۰/۰/۵۵	۳	۸۲۸/۶	۱۷/۱±۸۷۵
۱۴	۵۰	۰/۱	۲	۷۹۹/۹	۲۰/۱±۴۲۵
۱۵	۴۰	۰/۰/۵۵	۳	۹۱۶/۸	۱۶/۱±۵۷۵
۱۶	۳۰	۰/۰/۵۵	۳	۹۱۳/۲۵	۱۲/۱±۵۵
۱۷	۴۰	۰/۰/۵۵	۳	۹۰۹/۹۲	۱۸/۱±۱۵
۱۸	۴۰	۰/۰/۵۵	۴	۲۰۸۷/۷	۱۲/۱±۸
۱۹	۵۰	۰/۰/۱	۲	۴۸۳/۰/۸	۲۱/۱±۶۵
۲۰	۴۰	۰/۰/۱	۳	۶۷۹/۴۵	۱۸/۱±۷۲۵
Chemical method	۷۵	.	.	۱۱۲۴/۷۶	۱±۱۰

مطابق با آنچه در جدول ۲ مشاهده می‌شود مدل آزمون انجام‌شده در ارتباط با سطح پاسخ استحکام ژل در سطح ۹۹٪ معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.01$). همچنین آزمون عدم برازش در سطح ۹۵٪ معنی‌داری نمی‌باشد ($p > 0.05$) درواقع مدل به‌کاررفته به‌خوبی روند داده‌ها را نشان داده و از نظر خطای آزمایشی مرتکب شده اختلاف معنی‌داری بین واحدهای آزمایشی وجود ندارد. مقادیر p -value اثرات متغیر مستقل را نشان داده است نسبت آنزیم در سطح ۹۵٪ و pH در سطح ۹۹٪ بر میزان استحکام ژل استخراج‌شده اثر

خطی دارند. همچنین میزان pH در سطح اطمینان ۹۵٪ بر میزان استحکام ژل استخراج‌شده اثر توانی دارد ($p < 0.05$). با توجه به معادله چندجمله‌ای کد شده‌ی آزمون موردنظر نشان داد که اثر درجه‌دو و خطی pH بر میزان سطح پاسخ استحکام ژل بسیار کارا و مؤثر می‌باشد بطوریکه با کاهش pH میزان استحکام ژلاتین استخراج‌شده به‌طور چشمگیری کاهش یافته است.

Table 2- the ANOVA results of gelatin gel strength in respond surface method extracted from *Thunnus tonggol* skin by enzymatic method

Source of change	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F Value	P Value Probe > F	
Regression model	۳/۴۳۰E+۰۰۶	۹	۳/۸۱۱E+۰۰۵	۵/۲۲	۰/۰۰۸۲	Significance**
A: Temperature	۳/۰۵۱E+۰۰۵	۱	۳/۰۵۱E+۰۰۵	۴/۱۸	۰/۰۶۸۱	
B: Enzyme ratio	۵/۹۱۵E+۰۰۵	۱	۵/۹۱۵E+۰۰۵	۸/۱۱	۰/۰۱۷۳	Significance*
C: pH	۱/۴۹۰E+۰۰۶	۱	۱/۴۹۰E+۰۰۶	۲۰/۴۳	۰/۰۰۱۱	
AB	۷۷۲۵۰/۰۵	۱	۷۷۲۵۰/۰۵	۱/۰۶	۰/۷۷۳۲	Significance**
AC	۴۲۲۵۱/۷۹	۱	۴۲۲۵۱/۷۹	۰/۵۸	۰/۴۶۴۲	
BC	۲/۴۸۸E+۰۰۵	۱	۲/۴۸۸E+۰۰۵	۳/۴۱	۰/۰۹۴۵	
A ²	۱۹۶۷۶/۲۷	۱	۱۹۶۷۶/۲۷	۰/۲۷	۰/۶۱۴۸	
B ²	۵۷۶۳۷/۲۸	۱	۵۷۶۳۷/۲۸	۰/۷۹	۰/۳۹۴۹	
C ²	۶/۰۹۶E+۰۰۵	۱	۶/۰۹۶E+۰۰۵	۸/۳۶	۰/۰۱۶۱	Significance*
	۷/۲۹۵E+۰۰۵	۱۰	۷۲۹۴۹/۶۳			
lack of fit	۵/۷۹۶E+۰۰۵	۵	۱/۱۵۹E+۰۰۵	۳/۸۷	۰/۰۸۲۰	Lack of significance
Pure error	۱/۴۹۹E+۰۰۵	۵	۲۹۹۷۹/۰۹			

Significance at 99% confidence level, * * Significance at 95% confidence level*

دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. اگرچه مدل مکعب هم دارای R^2 بسیار بالا بود ولیکن به خاطر نتایج احتمالی گمراه کننده، از سوی نرم افزار به عنوان مدل انتخابی پیشنهاد نشد. زمانی می توان از این مدل استفاده نمود که بین تمامی فاکتورهای مورد بررسی حداقل معنی داری وجود داشته باشد. دقت تصمیم گیری برای مدل خطی بیشتر از مدل درجه دوم است اما به دلیل معنی دار شدن عدم برازش آن برای استفاده نامناسب می باشد. دقت تصمیم گیری بالاتر از ۴ (۹/۳۲۴) نشان از مناسب بودن و کفایت مدل انتخاب شده و پیشنهادی دارد. برای اینکه مدل پیشنهاد شده دارای توانایی خوبی جهت برازش اطلاعات داشته باشد باید ضریب تعیین تعدیل شده آن بالا باشد که برای مدل پیشنهادی درجه دوم این مقدار بیشتر از مدل خطی است.

بر اساس آنالیز واریانس داده های مربوط به استحکام ژل رابطه ریاضی زیر بر اساس مقادیر کد شده به دست آمد:

$$Y_{Gel\ Strength}=10246/71B-2363/64C+470/8C^2$$

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ می باشد (جدول ۳). ضریب تعیین $0/8246$ بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح می دهد یعنی اثر خطی و توانی متغیر pH و اثر خطی نسبت آنزیم، قادر است $82/46\%$ از تغییر پذیری سطح پاسخ استحکام ژل را کنترل نماید ($R^2 > 0/8246$). مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون عدم برازش (جدول ۳) مورد بررسی قرار گرفت که در مدل خطی معنی دار بوده ولی در مدل درجه دوم معنی دار نبود ($p > 0/05$). بنابراین مدل درجه دوم جهت پیش بینی در

Table 3- The statistical model for gelatin gel strength

Sources of change Model	standard deviation	R^2	R^2 adjustment	R^2 predicted	The accuracy of the decision	PRESS	
linear	۳۳۲/۸۱	۰/۵۷۳۹	۰/۴۹۴۰	۰/۲۶۰۷	۱۰/۸۰۲	۳/۰۷۵E±۰۰۶	suggested
interference	۳۲۸/۶۲	۰/۶۶۲۴	۰/۵۰۶۶	-۰/۴۹۴۶	-	۶/۲۱۶E±۰۰۶	
second degree cubic	۲۷۰/۰۹	۰/۸۲۴۶	۰/۶۶۶۷	-۱/۰۰۰۳	۹/۳۲۴	۸/۳۱۹E±۰۰۶	suggested
	۲۰۸/۰۸	۰/۹۳۷۵	۰/۸۰۲۲	-۳۱/۵۱۳۳	-	۱/۳۵۲E±۰۰۸	Aliased

بهینه سازی مدل: شرایط بهینه توسط نرم افزار با استفاده از آزمون بهینه سازی عددی (NOT) به دست آمد طبق جدول ۴.

Table 4- Optimization parameters for dependent variables and surface respond of gelatin gel strength

parameter	objective	The lowest level	The highest level	Lowest weight	Highest weight	Validity
-----------	-----------	------------------	-------------------	---------------	----------------	----------

Temperature	in range	۳۰	۵۰	۱	۱	۳
Enzyme ratio	in range	۰/۰۱	۰/۱	۱	۱	۳
pH	in range	۲	۴	۱	۱	۳
Gel strength	the most	۴۸۳/۰۸	۲۴۶۶/۳۶	۱	۱	۵

بعد از تنظیم محدوده‌ها، نقاط بهینه توسط نرم‌افزار به دست آمد. شرایط بهینه با مطلوبیت یا درجه مقبولیت (Desirability) نزدیک به یک (۰/۹۱۹) برای استحکام ژل بدین صورت است: دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت آنزیم ۰/۱ وزنی-وزنی، pH=۴، استحکام ژل ۲۳۰۶/۰۰۵ گرم، این در حالی است که در پژوهش حاضر، در همان دما و نسبت آنزیم و pH، میزان استحکام ژل بیشتر شد (۲۴۶۶/۳۶ گرم) و حاکی از آن است که داده‌های پیشگویی شده با داده‌های واقعی حاصل از آزمایش برازش خوبی داشته و داده‌های آزمایش ارتباط منطقی با مدل انتخابی دارند.

قدرت ژل از مهم‌ترین ویژگی‌های عملکردی ژلاتین بوده و تعیین‌کننده کیفیت ژلاتین تولیدی [۲۹] و تابعی از واکنش‌های متقابل پیچیده است که به توزیع آمینو اسید و نسبت زنجیره‌های آلفا و میزان ترکیبات بتا بستگی دارد [30]. به نظر می‌رسد اتصالات عرضی بین زنجیره‌های آلفا پایدارتر از اتصالات عرضی بین زنجیره‌های بتا می‌باشد [31]. ژلاتین با درصد زنجیره آلفا بالاتر استحکام ژل بالاتری را نشان می‌دهد [32] کیفیت ژلاتین به‌طور کلی توسط استحکام ژل یا شاخص یلوم، شامل بلوم کم (۱۵۰<)، متوسط (۱۵۰-۲۲۰) و بلوم بالا (۲۲۰-۳۰۰) تعیین می‌شود [33]. بهترین نوع ژلاتین، ژلاتین با بلوم بالا می‌باشد که دارای محدوده وسیعی برای کاربرد در صنایع غذایی به‌خصوص در فراوری ژله، گوشت کنسرو شده، مارشمالو و ماست هستند [34].

استحکام ژل بعد از قوام ژل به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. در روش استخراج

آنزیمی بالاترین قدرت ژل ژلاتین (۲۴۶۶/۳۶ گرم) مربوط به ژلاتین استخراج‌شده با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و درصد آنزیم ۰/۱ و pH=۴ 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 زنجیره‌های پلی پپتیدی توسط آنزیم، مناسب‌تر بوده است. این نتیجه با نتایج [35] که دریافتند با افزایش pH میزان اثر هیدرولیز آنزیم پاپائین بر روی زنجیره استخراجی کاهش می‌یابد و در نتیجه استحکام ژل بهبود می‌یابد، مطابقت داشت. استحکام این ژل به‌طور قابل‌توجهی از قدرت ژل استخراج‌شده به روش شیمیایی از پوست ماهی هور (g ۱۱۲۴/۷۶) بیشتر بود. کم‌تر بودن قدرت ژل در روش شیمیایی احتمالاً به خاطر اثر تخریبی مواد شیمیایی بر روی زنجیره پروتئینی و کوتاه شدن زنجیره آن می‌باشد. این نتیجه با نتایج حاصله [12]، که ژلاتین تهیه‌شده از پوست اسنپر چشم درشت (ماهی سرخو) را با استفاده از آنزیم پپسین بررسی کردند مطابقت داشت. این پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که در میان تمام نمونه‌ها، کمترین قدرت ژل مربوط به ژلاتین تهیه‌شده به روش شیمیایی بود که دلیل آن احتمالاً به این خاطر است که طول زنجیره‌های ژلاتین در زمان استخراج به روش شیمیایی کوتاه شده و در نتیجه شبکه ژل ضعیف‌تری تشکیل می‌دهد.

با مراجعه به داده‌های حاصل از این پژوهش کمترین میزان استحکام ژل در این مطالعه مربوط به تیمار ۱۹ با دمای ۵۰ و نسبت آنزیم ۰/۰۱٪ و pH=۲ می‌باشد. میزان استحکام ژل این تیمار در مقایسه با بهترین تیمار معادل (۰/۰۵٪) کمتر می‌باشد. که دلیل آن به خاطر آبکافت و فعالیت زیاد آنزیم

در این pH و به دنبال آن کوتاه شدن زنجیره‌های پلی پپتیدی پروتئین و در نتیجه استحکام پایین ژل می‌باشد. از سوی دیگر با مراجعه به تیمار مرکزی (تیمار ۱۷) مشاهده گردید که استحکام ژل مربوط به این تیمار معادل ۹۰۹/۹۲ گرم می‌باشد. که با مقایسه آن با بهترین تیمار و بدترین تیمار به ترتیب دارای قدرت ژلی معادل (۰/۰۲۸٪) کمتر و (۰/۰۲٪) بیشتر می‌باشد.

اختلاف معنی‌دار در قدرت ژلی می‌تواند به علت ویژگی‌های ذاتی، مانند توزیع وزن مولکولی باشد. در واقع ژلاتین با توزیع وزن مولکولی بالا دارای بلوم بالا و ژلاتین با زنجیره‌های کوتاه قدرت ژل پایین‌تری دارند [36]. رسیدن به استحکام بالا را می‌توان به علت استفاده از آنزیم و عدم تخریب زنجیره‌های آلفا و نقش آن‌ها در جلوگیری از تخریب اضافی پپتیدها دانست [24]. بهبود استحکام ژل و خواص ژلاتین تهیه‌شده از فلس کپور سرگنده به روش آنزیمی توسط [25] بررسی گردید و به این نتیجه رسیدند که استحکام ژل تهیه‌شده به روش آنزیمی بالاتر (7 ± 318 g) از ژلاتین تهیه‌شده به روش شیمیایی (3 ± 216 g) است.

۲-۳- اندازه‌گیری میزان بازده ژل

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد میزان بازدهی پودرهای استخراج شده بین ۷/۴۵٪ تا ۲۱/۶۵٪ در تیمارهای مختلف متفاوت است. با توجه به جدول بیشترین میزان بازدهی (۲۱/۶۵٪)

مربوط به تیمار ۱۹ با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم ۰/۰۱٪ و pH=۲ می‌باشد. میزان آبکافت آنزیم در این pH بالاتر بوده در نتیجه میزان پودر ژلاتین استخراج‌شده افزایش یافت. کمترین میزان بازدهی پودر ژلاتین استخراج‌شده مربوط به تیمار ۵ با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم ۰/۱٪ و pH=۴ می‌باشد. که دلیل آن میزان پایین آبکافت آنزیم در این pH می‌باشد.

مطابق با آنچه در جدول ۵ مشاهده می‌شود مدل آزمون انجام‌شده در ارتباط با سطح پاسخ بازده پودر ژلاتین استخراج‌شده در سطح ۹۵٪ معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$). همچنین آزمون عدم برازش در سطح ۹۵٪ معنی‌داری نمی‌باشد ($p > 0/05$) در واقع مدل به‌کاررفته به‌خوبی روند داده‌ها را نشان داده و از نظر خطای آزمایشی مرتکب شده اختلاف معنی‌داری بین واحدهای آزمایشی وجود ندارد. مقادیر p-value اثرات متغیر مستقل نشان را داده است pH در سطح ۹۵٪ و دما و pH در سطح ۹۹٪ به ترتیب بر میزان بازدهی پودر ژلاتین استخراج‌شده اثر خطی و اثر متقابل دارند. با توجه به معادله چندجمله‌ای کد شده‌ی آزمون موردنظر نشان داد که اثر خطی pH و اثر متقابل pH و دما بر میزان سطح پاسخ میزان بازده پودر ژلاتین استخراج‌شده بسیار کارا و مؤثر می‌باشد بطوریکه با کاهش pH میزان بازدهی پودر ژلاتین استخراج‌شده به‌طور چشمگیری افزایش یافت.

Table 5- the ANOVA results of gelatin yield in respond surface method extracted from *Thunnus tonggol* skin by enzymatic method

Source of change	sum of squares	degree of freedom	mean square	F Value	P Value Probe>F	
Regression model	۲۱۴/۵۶	۹	۲۳/۸۴	۱۴/۴۰	۰/۰۰۰۱	significance**
Temperature:A	۶۰/۰۲	۱	۶۰/۰۲	۳۶/۲۶	۰/۰۰۰۱	significance**
Enzyme ratio:B	۷/۴۰	۱	۷/۴۰	۴/۴۷	۰/۰۶۰۶	
pH:C	۱۱۲/۷۳	۱	۱۱۲/۷۳	۶۸/۱۰	<۰/۰۰۰۱	significance**

AB	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	۰/۱۵	۰/۷۰۳۶	
AC	۹/۷۴	۱	۹/۷۴	۵/۸۸	۰/۰۳۵۷	significance*
BC	۰/۲۲	۱	۰/۲۲	۰/۱۳	۰/۷۲۳۴	
A ²	۴/۲۴	۱	۴/۲۴	۲/۵۶	۰/۱۴۰۴	
B ²	۷/۵۶	۱	۷/۵۶	۴/۵۷	۰/۰۵۸۴	
C ²	۱۱/۰۵	۱	۱۱/۰۵	۶/۶۸	۰/۰۲۷۲	significance*
remaining lack of fit	۱۶/۵۵	۱۰	۱/۶۶			
	۱۳/۶۸	۵	۲/۷۴	۴/۷۷	۰/۰۵۵۸	Lack of significance
Pure error	۲/۸۷	۵	۰/۵۷			

Significance at 99% confidence level,* * Significance at 95% confidence level*

پاسخ موردنظر ارائه می‌دهد و می‌تواند آن را به‌خوبی پیش‌بینی نماید. یعنی ۹۲/۸۴٪ از متغیرهای مستقل قدرت توضیح دهنده‌گی متغیر وابسته را دارا می‌باشند. بطوریکه، متغیر pH و دما همبستگی زیادی با این تبیین دارد ($P < 0/01$). دقت تصمیم‌گیری بالاتر از بالاتر از ۴ (۱۴/۶۵۸) نشان از مناسب بودن و کفایت مدل انتخاب‌شده و پیشنهادی دارد. بالا بودن ضریب تبیین تعدیل‌شده این موضوع را تعیین و تأیید می‌کند به نحویکه شرایط غیر معنی‌داری در مدل مشاهده نشده است ($p < 0/05$). به‌طورکلی، این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود.

بر اساس آنالیز واریانس داده‌های مربوط به بازده پودر ژلاتین استخراج‌شده رابطه‌ی ریاضی زیر بر اساس مقادیر کد شده به دست آمد:

$$Y_{Yield} = -3.24611 + 0.88620A + 4.46175C + 0.11031AC - 2.00489C^2$$

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای درجه دوم به‌اندازه کافی بیانگر پاسخ می‌باشد (جدول ۶). ضریب تعیین مدل پیش‌بینی‌شده در مورد پاسخ میزان بازدهی ۹۲/۸۴٪ و مقدار p برای آزمون عدم برازش نیز ۰/۰۵۵۸ بود. بنابراین، مدل ارائه‌شده در معادله فوق برازش مناسبی برای

Table 6- The statistical model for extracted gelatin yield

Sources of change Model	standard deviation	R ²	R ² adjustment	R ² predicted	Precision decision	PRESS
linear	۱/۷۸	۰/۷۷۹۵	۰/۷۳۸۱	۰/۶۵۰۴	-	۸۰/۸۰
interference	۱/۷۷	۰/۸۲۳۷	۰/۷۴۲۳	۰/۵۵۹۹	-	۱۰۱/۷۱

<u>second degree</u> <u>cubic</u>	<u>۱/۲۹</u>	<u>۰/۹۲۸۴</u>	<u>۰/۸۶۳۹</u>	<u>۰/۶۲۶۰</u>	<u>۱۴/۶۵۸</u>	<u>۸۶/۴۲</u>	suggested
	۱/۲۵	۰/۹۵۹۲	۰/۸۷۰۹	-۳۳/۸۳۹۹	-	۸۰۵۱/۹۲	Aliased

بهینه‌سازی مدل: شرایط بهینه توسط نرم‌افزار با استفاده از
آزمون بهینه‌سازی عددی (NOT) به دست آمد. جدول ۷
پارامترهای بهینه برای متغیرهای مستقل و سطح پاسخ متغیر
وابسته را نشان می‌دهد.

Table 7- Optimization parameters for dependent variables and surface respond of gelatin yield

parameter	objective	The lowest level	The highest level	Lowest weight	Highest weight	Validity
Temperature	in range	۳۰	۵۰	۱	۱	۳
Enzyme ratio	in range	۰/۰۱	۰/۱	۱	۱	۳
pH	in range	۲	۴	۱	۱	۳
Yield	the most	۷/۴۵	۲۱/۶۵	۱	۱	۵

(۰/۰۱٪) و بیشترین دما (۵۰ درجه سانتی‌گراد) برای استخراج ژلاتین بازده آن را نسبت به روش شیمیایی بیش از دو برابر افزایش داد. بنابراین به نظر می‌رسد در pH پایین و پایین‌ترین سطح آنزیم و بالاترین سطح دما که بالاترین بازدهی به دست آمده انتظار می‌رود در همین سطح pH با افزایش درصد آنزیم از ۰/۰۱ به ۰/۱ بتوان بازدهی بالاتری را به دست آورد اما در این مطالعه خلاف این امر مشاهده گردید. که این بدین معنی است در pH=۲ فعالیت آنزیم بسیار کاهش یافته است، و عمده‌ترین فعالیت هیدرولیزی منحصرأً مربوط به عملکرد خود pH و دما می‌باشد نه آنزیم. زیرا در تیمار ۰/۱٪ آنزیم و pH=۲ میزان بازدهی معادل ۱۷/۵۵٪ (تیمار ۱۱) که خود مؤید این امر می‌باشد.

با مراجعه به داده‌های حاصل از این پژوهش کمترین میزان بازده ژلاتین استخراج شده مربوط به تیمار ۵ با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و درصد آنزیم ۰/۱٪ و pH=۴ بوده است که با توجه به داده‌های به دست آمده میزان بازده در این تیمار

بعد از تنظیم محدوده‌ها، نقاط بهینه توسط نرم‌افزار به دست آمد. بهترین شرایط بهینه با مطلوبیت یا درجه مقبولیت (Desirability) نزدیک به یک (۰/۹۹۷) برای بازدهی بدین صورت است: دما ۴۶/۳۹۶ درجه سانتی‌گراد، نسبت آنزیم ۰/۰۱٪ وزنی-وزنی، pH=۲/۳۸۱، بازدهی پودر ژلاتین استخراج شده ۲۱/۶۰۸٪، این در حالی است که در پژوهش حاضر، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم ۰/۰۱٪ وزنی-وزنی و pH=۲ میزان بازدهی اندکی بیشتر شد (۲۱/۶۵٪) و حاکی از آن است که داده‌های پیشگویی شده با داده‌های واقعی حاصل از آزمایش برازش خوبی دارند و داده‌های آزمایش ارتباط منطقی با مدل انتخابی دارند.

بیشترین میزان بازده ژلاتین تولیدی به روش آنزیمی از پوست ماهی هوور مربوط به تیمار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و درصد آنزیم ۰/۰۱٪ وزنی-وزنی و pH=۲ (۲۱/۶۵٪) بود و میزان آن در روش شیمیایی ۱۰٪ بود. در این مطالعه مشاهده شد که استفاده از کمترین میزان آنزیم

بود [13]. تفاوت در میزان بازده ممکن است به دلیل تفاوت در گونه ماهی، شرایط بیولوژیکی و روش‌های آماده‌سازی مرتبط باشد [40]. در رابطه با میزان بازده کلاژن استخراج‌شده توسط آنزیم پپسین از پوست و کیسه شنا و باله‌ها، فلس‌ها و استخوان‌ها صورت گرفت دریافتند که بیشترین میزان بازده کلاژن به ترتیب از پوست، کیسه شنا سپس باله‌ها، فلس‌ها و استخوان‌ها به دست آمد. نتایج نشان داد که پپسین در افزایش بازده ژلاتین استخراج‌شده از پوست ماهی هوور مؤثر بوده است.

۳-۳- اندازه‌گیری رنگ ژل

نتایج حاصل از اندازه‌گیری رنگ پودر ژلاتین استخراج‌شده در جدول ۸ آورده شده است. به منظور بررسی رنگ پودرهای تولیدی مقادیر L^* ، a^* و b^* و W اندازه‌گیری شدند. فاکتور L میزان روشنایی، a^* محدوده قرمز-سبز و b^* محدوده آبی - زرد و W میزان سفیدی را نشان می‌دهند. بیشترین کمترین میزان روشنایی مربوط به تیمار ۱۳ و تیمار ۱۱، بیشترین و کمترین میزان قرمزی مربوط به تیمار ۷ و تیمار استخراج‌شده به روش شیمیایی، همچنین بیشترین میزان زردی به تیمارهای استخراج‌شده به روش شیمیایی و کمترین میزان آن مربوط به تیمارهای ۸، ۱۳ و ۲۰ می‌باشد. بیشترین و کمترین میزان سفیدی مربوط به تیمار ۶ و ۱۱ می‌باشد.

در مقایسه با تیماری که بیشترین میزان بازده را داشته (تیمار ۱۹) معادل (۰/۰۳٪) کمتر می‌باشد. از سوی دیگر با مراجعه به تیمار مرکزی (تیمار ۱۷) مشاهده شد که بازده ژلاتین استخراج‌شده مربوط به این تیمار معادل (۰/۱۸/۱۵٪) می‌باشد که با مقایسه آن با تیماری که بیشترین میزان بازده را داشته (تیمار ۱۹) و تیماری که کمترین میزان بازده (تیمار ۵) به ترتیب دارای بازدهی معادل (۰/۰۱۲٪) کمتر و (۰/۰۲٪) بیشتر می‌باشد.

بازده پایین ژلاتین تهیه‌شده به روش شیمیایی ممکن است به علت حلالیت پایین پیوندهای عرضی شکل گرفته از طریق واکنش آلدهید با لیزین و هیدروکسی لیزین در قسمت‌های مارپیچی پتید انتهایی باشد [37]. اشباع بودن کلاژن پوست و تخریب آن در طول فرآیند استخراج و تبدیل آن به ژلاتین می‌تواند یکی از دلایل بازده پایین ژلاتین در طول استخراج شیمیایی باشد [38] هضم محدود پپسین که بیشتر می‌شود، احتمال بیشتری برای شکستن مولکول‌های دخیل در پیوند عرضی تلوپتید وجود دارد، در نتیجه کارایی استخراج کلاژن افزایش می‌یابد [12]. در مطالعه‌ای بر خواص کلاژن محلول استخراج‌شده به کمک پپسین و اسید از فلس بز ماهی به این نتیجه رسیدند که میزان بازده کلاژن استخراج‌شده بر اساس وزن خشک به کمک پپسین (۰/۱/۲٪) و در روش شیمیایی (۰/۴۶٪) یعنی حدود ۲/۶۱ برابر افزایش یافت [39]. بازده کلاژن استخراج‌شده به روش اسیدی و از طریق پپسین از فلس کپور بر اساس وزن خشک به ترتیب ۰/۸۶٪ و ۲/۳۲٪

Table 8- The color data of gelatin powder extracted by enzymatic method from *Thunnus tonggol* skin

Treatment	(°C) Temperature	Enzyme (%) ratio	pH	L	a*	b*	W
۱	۴۰	۰/۱	۳	۶۷/۳±۹۷/۳۹	-۰/۲±۱۲/۶۵	۲/۲±۴/۸۹	۶۸/۳±۶۸/۴۳
۲	۳۰	۰/۰۱	۲	۷۷/۲±۲۹/۸۶	-۰/۱±۷۶/۰۶	۱/۱±۸۹/۶۷	۷۷/۲±۱۳/۸۶
۳	۵۰	۰/۱	۴	۷۱/۴±۲۴/۲۷	-۰/۲±۰۹/۰۴	۱/۲±۳۶/۵۹	۷۱/۴±۰۳/۳۵
۴	۵۰	۰/۰۵۵	۳	۷۳/۱±۴۲/۰۸	-۱/۱±۹۸/۱۹	۴/۲±۸۷/۱۶	۷۲/۱±۸۱/۳۶
۵	۳۰	۰/۱	۴	۷۵/۲±۰۵/۳۳	-۲/۱±۵۲/۵۷	۵/۲±۹۷/۲۹	۷۴/۲±۱۳/۷۱
۶	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۹/۱±۳۹/۰۴	-۰/۰±۶۱/۵۷	۱/۱±۰۳/۰۲	۷۹/۱±۳۶/۰۳
۷	۵۰	۰/۰۱	۴	۷۶/۴±۶۵/۰۹	۰/۲±۴۲/۱۹	۱/۱±۵۳/۵۵	۷۳/۴±۵/۱۴

۸	۳۰	۰/۰۱	۴	۶۹/۲±۱۶/۴	۰	۰	۶۹/۲±۱۶/۴
۹	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۷/۱±۸۷/۱۳	-۲/۱±۱۲/۵۸	۵/۲±۵۲/۱۴	۷۷/۱±۸۶/۳۲
۱۰	۴۰	۰/۰۵۵	۲	۶۸/۲±۵/۶۴	-۱/۱±۳۸/۳۵	۹/۴±۶۰/۷۷	۶۶/۲±۷۵/۶۹
۱۱	۳۰	۰/۱	۲	۶۴/۳±۸۴/۷	-۱/۲±۸۹/۴۴	۸/۱±۸۳/۷۱	۶۳/۳±۵۸/۳۵
۱۲	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۷/۱±۴۵/۱۷	-۱/۱±۳۶/۰۷	۳/۱±۲۷/۵۸	۷۷/۱±۰۲/۳۵
۱۳	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۹/۱±۸۱/۰۱	۰	۰	۷۹/۱±۸۱/۰۱
۱۴	۵۰	۰/۱	۲	۷۱/۲±۷۸/۰۴	-۵/۰±۹۹/۴۴	۱۲/۱±۷۲/۳۹	۶۸/۱±۴۲/۶۵
۱۵	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۸/۱±۹۸/۰۸	-۰/۰±۶۱/۵۷	۱/۱±۰۳/۰۲	۷۸/۱±۹۲/۰۶
۱۶	۳۰	۰/۰۵۵	۳	۷۴/۱±۲۴	-۱/۰±۰۹/۷۷	۲/۱±۱۴/۷۸	۷۴/۱±۰۷/۱
۱۷	۴۰	۰/۰۵۵	۳	۷۵/۱±۹۳/۲۶	-۲/۱±۱۲/۵۸	۵/۲±۵۲/۱۴	۷۵/۱±۱۲/۶۴
۱۸	۴۰	۰/۰۵۵	۴	۷۳/۴±۷۱/۴۹	-۱/۱±۰۲/۳۹	۱/۲±۹۴/۶۶	۷۳/۴±۵۱/۵۶
۱۹	۵۰	۰/۰۱	۲	۷۵/۱±۸/۲۴	-۱/۱±۲۴/۲۷	۴/۱±۳۵/۷۹	۷۵/۱±۳۱/۳۵
۲۰	۴۰	۰/۰۱	۳	۷۸/۱±۸۶/۲۴	۰	۰	۷۸/۱±۸۶/۲۴
chemic	۷۵	۰	۰	۶۹/۴±۴۷/۴۱	-۵/۲±۴۶/۹۹	۱۴/۳±۸۱/۳۸	۶۵/۳±۳۰/۴۱

متغیر مستقل نشان را داده است نسبت آنزیم در سطح ۹۹٪ و نسبت آنزیم و pH در سطح ۹۹٪ بر میزان سفیدی پودر ژلاتین استخراج شده اثر متقابل دارند. با توجه به معادله چندجمله‌ای کد شده‌ی آزمون موردنظر نشان می‌دهد اثر نسبت آنزیم بر میزان سطح پاسخ سفیدی بسیار کارا و مؤثر می‌باشد بطوریکه با کاهش نسبت آنزیم میزان سفیدی پودر ژلاتین استخراج شده به‌طور چشمگیری افزایش یافته است.

مطابق با نتایج جدول ۹ مشاهده می‌شود مدل آزمون انجام شده در ارتباط با سطح پاسخ میزان سفیدی (W) در سطح ۹۵٪ معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). همچنین آزمون عدم برازش در سطح ۹۵٪ معنی‌داری نمی‌باشد ($p > 0.05$) درواقع مدل به‌کاررفته به‌خوبی روند داده‌ها را نشان داده و از نظر خطای آزمایشی مرتکب شده اختلاف معنی‌داری بین واحدهای آزمایشی وجود ندارد. مقادیر p-value اثرات

Table 9- the ANOVA results of gelatin powder whiteness in respond surface method extracted from *Thunnus tonggol* skin by enzymatic method

Source of change	sum of squares	degree of freedom	mean square	F Value	P Value Probe>F	
Regression model	۱۵۶/۵۱	۶	۲۶/۰۸	۴/۰۵	۰/۰۱۶۶	significance*
A: Temperature	۰/۹۰	۱	۰/۹۰	۰/۱۴	۰/۷۱۴۷	
B: Enzyme ratio	۷۹/۰۷	۱	۷۹/۰۷	۱۲/۲۶	۰/۰۰۳۹	Significance**
C:pH	۱۰/۲۸	۱	۱۰/۲۸	۱/۵۹	۰/۲۲۸۸	
AB	۰/۰۷۶	۱	۰/۰۷۶	۰/۰۱۲	۰/۹۱۵۲	
AC	۰/۴۰	۱	۰/۴۰	۰/۰۶۱	۰/۸۰۸۱	

CB	۶۵/۷۸	۱	۶۵/۷۸	۱۰/۲۰	۰/۰۰۷۰	Significance**
remaining lack of fit	۸۳/۸۲	۱۳	۶/۴۵			
	۷۳/۰۶	۸	۹/۱۳	۴/۲۴	۰/۰۶۴۱	Lack of significance
Pure error	۱۰/۷۶	۵	۲/۱۵			
Core Total	۲۴۰/۳۳	۱۹				

Significance at 99% confidence level,* * Significance at 95% confidence level*

متغیر دما و pH و اثر خطی نسبت آنزیم، قادر است ۶۵/۱۲٪ از تغییرپذیری سطح پاسخ استحکام ژل را کنترل نماید ($R^2 > ۰/۶۵۱۲$). مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون عدم برازش (جدول ۹) موردبررسی قرار گرفت که در این مدل معنی دار نبود ($p > ۰/۰۵$). بنابراین مدل تداخلی جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. دقت تصمیم‌گیری بالاتر از ۴ (۸/۲۵۷) نشان از مناسب بودن و کفایت مدل انتخاب‌شده و پیشنهادی دارد.

بر اساس آنالیز واریانس داده‌های مربوط به میزان سفیدی پودر ژلاتین استخراج‌شده رابطه‌ی ریاضی زیر بر اساس مقادیر کد شده به دست آمد:

$$Y_{\text{Whiteness}} = -244.98889B + 63.72222BC$$

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای تداخلی به‌اندازه کافی بیانگر پاسخ می‌باشد (جدول ۱۰). ضریب تعیین ۰/۶۵۱۲ بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به‌خوبی توضیح می‌دهد یعنی اثر متقابل

Table 10- The statistical model for whiteness of extracted gelatin powder

Sources of model change	standard deviation	R ²	R ² adjustment	R ² predicted	Accuracy of decision	PRESS	
linear	۳/۰۶	۰/۳۷۵۵	۰/۲۵۸۵	-۰/۲۵۳۵	-	۳۰۱/۲۶	
<u>interference</u>	<u>۲/۵۴</u>	<u>۰/۶۵۱۲</u>	<u>۰/۴۹۰۲</u>	<u>-۱/۰۴۴۳</u>	<u>۸/۲۵۷</u>	<u>۴۹۱/۳۱</u>	<u>suggested</u>
second degree cubic	۲/۵۸	۰/۷۲۴۰	۰/۴۷۵۵	-۲/۴۴۳۶	-	۸۲۷/۶۱	
	۱/۴۴	۰/۹۴۸۶	۰/۸۳۷۲	-۷/۲۰۳۴	-	۱۹۷۱/۵۲	Aliased

پارامترهای بهینه برای متغیرهای مستقل و سطح پاسخ متغیر وابسته را نشان می‌دهد.

بهینه‌سازی مدل: شرایط بهینه توسط نرم‌افزار با استفاده از آزمون بهینه‌سازی عددی (NOT) به دست آمد. جدول ۱۱

Table 11- Optimization parameters for dependent variables and surface respond related to the whiteness of gelatin powder

parameter	objective	The lowest level	The highest level	Lowest weight	Highest weight	Validity
Temperature	in range	۳۰	۵۰	۱	۱	۳
Enzyme ratio	in range	۰/۰۱	۰/۱	۱	۱	۳
pH	in range	۲	۴	۱	۱	۳
W	the most	۶۳/۵۸	۷۸/۸۶	۱	۱	۵

روش آنزیمی از پوست سپر ماهی با ژلاتین گاوی استخراج شده به روش شیمیایی توسط [42] 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.

۴- نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که می توان از پوست ماهی هوور به عنوان منبعی ارزان قیمت و قابل دسترس و روش آنزیمی به عنوان روشی مناسب برای استخراج ژلاتین استفاده کرد، زیرا بنابر نتایج به دست آمده، ژلاتین استخراجی از نظر استحکام ژل که پس از ۱۸-۱۶ ساعت قوام در ۴ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد ۲۴۶۶/۳۶ گرم بود؛ این استحکام بالا در شرایط بهینه دمای ۳۰°C، درصد آنزیم ۰/۱ w/w% و pH=۴ حاصل شد، که نشان دهنده حفظ زنجیره های آلfa به دلیل هیدرولیز کنترل شده توسط آنزیم است. همچنین ژلاتین تولید شده به روش آنزیمی بازده قابل قبول ۲۱/۶۵٪ داشت که بیش از دو برابر روش شیمیایی است؛ بیشترین بازده در دمای ۵۰°C، نسبت آنزیم ۰/۰۱ w/w% و pH=۲ به دست آمد. افزون بر این، ژلاتین استخراج شده به روش آنزیمی از نظر شاخص های رنگی (L*, a*, W) نتایج بهتری نسبت به ژلاتین تهیه شده به روش شیمیایی نشان داد.

بعد از تنظیم محدوده ها، نقاط بهینه توسط نرم افزار به دست آمد. بهترین شرایط بهینه با مطلوبیت یا درجه مقبولیت (Desirability) نزدیک به یک (۰/۸۹۲) برای میزان سفیدی پودر ژلاتین استخراج شده بدین صورت است: دما ۵۰ درجه سانتی گراد، نسبت آنزیم ۰/۰۱ وزنی-وزنی، pH=۲، سفیدی ۷۷/۲۱۷، در حالی است که در پژوهش حاضر، در این دما و نسبت آنزیم و pH، میزان سفیدی نزدیک به همان مقدار شد (۷۵/۳۱) که حاکی از آن است داده های پیشگویی شده با داده های واقعی حاصل از آزمایش برازش خوبی دارند و داده های آزمایش ارتباط منطقی با مدل انتخابی دارند. رنگ ژلاتین به طور کلی وابسته به شرایط استخراج و مواد خام اولیه است. رنگ ژلاتین جزء خواص زیبایی شناسی آن است و به کاربرد آن وابسته است. ضمناً رنگ اثری بر خواص عملکردی ژلاتین ندارد [41]. 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، 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 معنی دار است (p<0/05)، رنگ ژلاتین استخراج شده به

۵-منابع

- [1]. BAILEY, A. J., PAUL, R. G., & KNOTT, L. 1998. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of ageing and development*, 108, 439-445.
- [2]. RAHMAN, M. S., AL-SAIDI, G. S., & GUIZANI, N. 2008. Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. *Food Chemistry*, 108, 472-481.
- [3]. YANG, H., WANG, Y., JIANG, M., OH, J. H., HERRING, J., & ZHOU, P. 2007. 2-Step Optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin gelatin. *Food Science*, 72.
- [4]. GILSENAN, P. M., AND ROSS-MURPHY, S.B. 2000b. Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *J.Food Hydrocolloids*, 12, 191- 195.
- [5]. KOŁODZIEJSKA, I., KACZOROWSKI, K., PIOTROWSKA, B., & SADOWSKA, M. 2004. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chemistry*, 86, 203-209.
- [6]. A., A. Q. M. 2011. Application of fish gelatin as one of the most important sources of halal gelatin in the world. . first national food security seminar. [in Persian]
- [7]. 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.
- [8]. WILESMITH, J. W., RYAN, J. B., & ATKINSON, M. J. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *The veterinary record*, 128, 199-203.
- [9]. KARIM, A. A., & BHAT, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food hydrocolloids*, 23, 563-576.
- [10]. TONG, Y., & YING, T. 2013. Gelling strength improvement and characterization of a gelatin from scales of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11, 146-150.
- [11]. ZHAO, L., BUDGE, S. M., GHALY, A. E., BROOKS, M. S., & DAVE, D. 2011. Extraction, purification and characterization of fish pepsin: a critical review. *J Food Process Technol*, 2, 6-2.
- [12]. NALINANON, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., & KISHIMURA, H. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104, 593-601.
- [13]. ZHANG, Y., LIU, W., LI, G., SHI, B., MIAO, Y., & WU, X. 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). . *Food chemistry*, 103, 912-906.
- [14]. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food chemistry*, 93(3), 475-484.
- [15]. Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2008). Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food hydrocolloids*, 22(4), 615-622.
- [16]. JONGJAREONRAK, A., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., NAGAI, T., & TANAKA, M. 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93, 475-484.
- [17]. SOGAWA, K., FUJII-KURIYAMA, Y., MIZUKAMI, Y., ICHIHARA, Y., & TAKAHASHI, K. 1983. Primary structure of human pepsinogen gene. *Biological Chemistry*, 258, 5306-5311.
- [18]. KAGEYAMA, T., & TAKAHASHI, K. 1976. Pepsinogens and pepsins from gastric mucosa of Japanese monkey Purification and characterization. *The Journal of Biochemistry*, 79, 455-468.
- [19]. NIELSEN, P. K., & FOLTMANN, B. 1995. Purification and characterization of porcine pepsinogen B and pepsin B. *Archives of biochemistry and biophysics*, 322, 417-422.
- [20]. MARTIN P. TRIEU-CUOT P., C. J., RIBADEAU DUMAS B. 1982. Purification and characterization of bovine gastricsin. *European Journal of Biochemistry*, 122, 31-39.
- [21]. SUZUKI, M., NARITA, Y., ODA, S. I., MORIYAMA, A., TAKENAKA, O., & KAGEYAMA, T. 1999. Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 122, 453-460.
- [22]. MUTO, N., & TANI, S. 1979. Purification and characterization of rat pepsinogens whose contents increase with developmental progress. *The Journal of Biochemistry*, 85, 1143-1149.
- [23]. KAGEYAMA, T., TANABE, K., & KOIWAI, O. 1990. Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 17031-17038.

- [24]. FENG, W., ZHAO, T., ZHOU, Y., LI, F., ZOU, Y., BAI, S., ... & WU, X. 2013. Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of collagen from Chinese sturgeon (*Acipenser sturio* Linnaeus) skin. *Pharmacognosy magazine*, 9, S32.
- [25]. MOHTAR, N. F., PERERA, C. O., QUEK, S. Y., & 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.
- [26]. El Mohtar, C. S., Bobet, A., Santagata, M. C., Drnevich, V. P., & Johnston, C. T. (2013). Liquefaction mitigation using bentonite suspensions. *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering*, 139(8), 1369-1380.
- [27]. Alfaro, E. C., Umaña-Taylor, A. J., Gonzales-Backen, M. A., Bámaca, M. Y., & Zeiders, K. H. (2009). Latino adolescents' academic success: The role of discrimination, academic motivation, and gender. *Journal of adolescence*, 32(4), 941-962.
- [28]. CHANARAT, S., & 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.
- [29]. GILSENAN, P. M., & ROSS-MURPHY, S. B. 2000a. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14, 191-195.
- [30]. CHO, S. M., KWAK, K.S., PARK, D.C., GU, Y.S., JI, C. I., JANG, D. H., LEE, Y. B., AND KIM, S. B. 2004. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *J.Food Hydrocolloids*, 18, 573-579.
- [31]. HAIYING LIU., D. L., AND SHIDONG GUO, 2008. Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin from fish skins preserved by different methods. *J. Science Direct*, 41, 1425-1430.
- [32]. CHEOW, C. S., NORIZAH, M.S., KYAW, Z.Y., AND HOWELL, N.K. 2007. Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *J.Food chemistry*, 101, 386-391.
- [33]. JOHNSTON-BANKS, F. A. 1990. *Food gels*, London, Elsevier Applied Science Publ.
- [34]. D., H. 1996. Gelatin production. *US patent*, 5, 484,888.
- [35]. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL , K. R. & KITTINAN KOMOLPIS , W. T. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14, 202-206.
- [36]. VEIS, A. 1964. *The macromolecular chemistry of gelatin*, New York, Academic Press.
- [37]. KNOTT, L., & BAILLEY, A. J. 1998. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Review Article*, 22.
- [38]. JAMILAH, B. H., KG 2002. Properties of gelatins from skins of fish: black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77, 81-84.
- [39]. KANOKWAN MATMAROH , S. B., THUMMANOON PRODPRAN , ANGEL B. ENCARNACION , & 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.
- [40]. REGENSTEIN, J. M., & ZHOU, P. 2007. *Collagen and gelatin from marine by-product*, Maximising the value of marine by-products.
- [41]. OCKERMAN, H. W., & HANSEN, C. L. 1988. *Glue and gelatin animal by-product processing*, New York, Ellis Horwood.
- [42]. Lassoued, I., Jridi, M., Nasri, R., Dammak, A., Hajji, M., Nasri, M., & 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.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Enzymatic assisted extraction of gelatin from *Thunnus tonggol* skin

Parisa Feizi¹, Alireza Salarzadeh^{2*}

1-, Ph.D in Food Science & Technology , Dept. of Food Science & Technology, college of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources.

2*-, Ph.D in Fisheries , Associate Professor, Dept. of Fisheries , Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas , Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/10/23 Accepted:2025/6/9 Keywords: Enzymatic extraction, Gelatin, Gel strength, Color, Yield DOI: 10.22034/FSCT.22.166.56. *Corresponding Author E- Reza1375bandar@yahoo.com	Gelatin is a water-soluble component and is achievable as a result of partial hydrolysis of collagen and it has many applications in food industry and nutrition science. Therefore, the current research was conducted in relation to gelatin extraction from inexpensive and available sources. 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 <i>Thunnus tonggol</i> skin. Accordingly, the firmness, yield and color of resultant gelatin were determined. Based on the results, despite form 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 that the chemical extracted one ($p<0.05$). The highest lightness was observed at 40 C, 0.055% enzyme at pH=3. According to the results, the highest gelatin yield 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. In conclusion, by application of 30 C and 0.1% enzyme at pH=4 the highest gelatin yield is achievable, while using 50 C and 0.01% enzyme at pH=2 could result the gelatin with the highest firmness.