# بهینه سازی استخراج آنزیمی ژلاتین خوراکی از استخوان گاو با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

سید هاشم حسینی پرور[۱]، جواد کرامت[۲]، مهدی کدیور[۲]، الهام خانی پور[۳]، الناز میلانی[۴]

تاریخ دریافت:۸۴/۷/۲۷

## چکیده

ژلاتین، هیدروکلوئیدی از جنس پروتئین است که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد در ایجاد ژل، قوام دهندگی، پایدار کنندگی، امولسیفایری، تشکیل کف و فیلم در صنایع غذایی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق به منظور تعیین شرایط بهینهٔ استخراج ژلاتین به روش آنزیمی از استخوان گاو، به ترتیب اثر سه متغیر غلظت آنزیم (۱۰-۲ پی پی ام)، زمان (۱۶-۸ ساعت) و دما (۸۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد) بر روی راندمان استخراج، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب ژلاتین استخراجی در طول موج ۴۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طرح آزمایشی مرکب مرکزی انجام شده به روش رگرسیون سطح پاسخ (RSREG) تجزیه تحلیل شد. ضرایب همبستگی مدلهای رگرسیون برازش داده شدهٔ راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر برای فرایند استخراج آنزیمی به ترتیب ۰/۹۵۲۶، ۰/۹۹۸، ۰/۹۹۵ و ۰/۹۳۵ تعیین شدند.آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند در مدلهای رگرسیون استخراج آنزیمی نشان داد که اثر هر سه متغیر غلظت آنزیم، زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج در مدلهای رگرسیون استحکام ژل و ویسکوزیته معنی‌دار بودند، اما اثر دما در مدلهای رگرسیون راندمان و جذب معنی‌دار نبودند. شرایط اپتیمم در استخراج آنزیمی برای حداکثر راندمان، استحکام ژل و ویسکوزیته و حداقل جذب که در آزمایش عملی مورد تایید قرار گرفته بترتیب (۶/۱ پی پی ام، ۱۵/۶ ساعت، ۷۰ درجه سانتیگراد)، (۹/۱ پی پی ام ،۱۱/۹ ساعت، ۷۰/۳ درجه سانتیگراد)، (۷/۸۶ پی پی ام، ۱۴/۹ ساعت، ۷۷/۵ درجه سانتیگراد) و (۲/۸ پی پی ام، ۱۰ ساعت، ۶۰ درجه سانتیگراد) تعیین شدند.

**واژه‌های کلیدی: ژلاتین، استخراج آنزیمی، بهینه سازی سطح پاسخ.**

## مقدمه

ژلاتین عبارتست از یک پلی پپتید با وزن ملکولی بالا که از کلاژن بافت‌های پیوندی، پوست، استخوان و تاندونها مشتق می‌شود (۱۴و۷). ژلاتین با آب تشکیل ژلی می‌دهد که تحت تاثیر حرارت برگشت‌پذیر[۵] می‌باشد. نقطه ذوب ژل (کمتر از ۳۵ درجه سانتیگراد) پائین‌تر از دمای بدن انسان می‌باشد که این ویژگی به محصولات ژلاتین خصوصیات طعمی و ارگانولپتیکی منحصر به فردی داده است (۱۴).

تفاوت روش‌های تولید ژلاتین بستگی به روش بکار گرفته شده بر روی مواد خام اولیه دارد. بر حسب اینکه از چه پیش تیماری استفاده گردد، چهار روش برای تولید ژلاتین وجود دارد که عبارتند از: روش اسیدی، روش قلیایی، روش پراکسید هیدروژن و روش آنزیمی. روش

۱- دانشجوی دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
پست الکترونیکی: hosseiniparvar@yahoo.com
۲- اعضای هیئت علمی گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.
۳- عضو هیئت علمی گروه مهندسی علوم صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله آملی.
۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد

5- Thermally Reversible

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج آنزیمی ژلاتین که در این پژوهش از آن استفاده شده نسبت به سایر روشهای استخراج مزایای زیادی دارد که از آن جمله می‌توان به مقرون به صرفه بودن، عدم استفاده زیاد از مواد شیمیایی، کنترل بهتر فرآیند استخراج، امکان تولید ژلاتینهایی با خواص مختلف تحت شرایط کنترل شده و ... اشاره کرد(۱۲و۱۳). مواد اولیهٔ خامی که ژلاتین از آنها استخراج می‌شود عبارتند از: استخوان دمینراله (اوسئین)، پوست خوک، پوست گاو و پوست ماهی. مطلوب‌ترین مادهٔ اولیه حاوی کلاژن برای تولیدژلاتین باکیفیت بالا، استخوان گاواست که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است(۱۰). قبل از انجام پیش تیمار و در ادامه تولید ژلاتین، معمولا بر روی مواد خام حاوی کلاژن بسته به نوع آنها، یکسری اعمال صورت می‌گیرد که عبارتند از: درجه‌بندی، چربی گیری، کاهش اندازه و دمینراله کردن. روش‌های خالص‌سازی ژلاتین استخراج شده بسته به اینکه تا چه سطحی انجام شود متفاوت است. محلول ژلاتین می‌تواند از طریق فلوکوله کردن، که طی آن پروتئین‌های غیرژلاتینی و لیپیدها حذف می‌شوند، شفاف‌سازی گردد(۱۰).برای تصفیه بیشتر می‌توان از فیلتراسیون ریز[1] و یا ستون‌های تعویض یونی کاتیونی و آنیونی و نیز فرآیندهای میکروفیلتراسیون استفاده کرد(۴). به منظور بوگیری[2] محلول ژلاتین معمولاً از کربن اکتیو به میزان ۰/۳ گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خام استفاده می‌شود و سپس فیلتراسیون مجدد صورت می‌گیرد (۷). پس از خالص سازی محلول ژلاتین آنرا تحت خلاء و در دماهای پایین تغلیظ کرده و خشک می‌کنند، آنگاه ژلاتین خشک شده را آسیاب کرده و پس از بسته‌بندی به بازار عرضه می‌کنند(۴). در این پژوهش استخراج آنزیمی ژلاتین خوراکی از استخوان صورت گرفت، پس از خالص‌سازی محلول ژلاتین فاکتورهای کیفی و راندمان ژلاتین بعنوان تابعی از متغیرهای فرآیند مدل شده و بهینه سازی به روش سطح پاسخ انجام شد.

## مواد و روش‌ها

استخوان گاو مورد استفاده در این تحقیق از شرکت فرآورده‌های گوشتی صنوبر، ژلاتین تجارتی از شرکت بیگروف[3] وآنزیم پروتئاز نوتراز از شرکت نووو[4] تهیه شدند. کلیه مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان تجهیزات مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: آسیاب چکشی، دستگاه اندازه‌گیری خصوصیات بافت، مدل ۱۱۴۰، ساخت شرکت اینسترون[5] انگلستان،آون معمولی، ساخت شرکت هراوس[6] آلمان، ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱± ساخت شرکت شیمادزو[7] ژاپن، دستگاه ویسکوزیمتر بروکفیلد[8] ساخت آمریکا، هات پلیت مجهز به همزن مغناطیسی ساخت شرکت روهرو آلمان، دستگاه اندازه‌گیری پروتئین میکروکلدال ساخت شرکت بوخی[9] سوئد (شامل بخش‌های هضم و تقطیر)، دستگاه pH متر مدل ۷، ساخت شرکت کورنینگ ایل انگستان[10]، دستگاه اسپکتروفتومتر کم اسپک[11] مدل ۳۵۰ (دوپرتویی، UV-مرئی ساخت انگلستان)، دستگاه تبخیر کنندهٔ چرخان ساخت شرکت هیدولف[12] آلمان، دستگاه سانتریفوژ سیگما

1 - Fine Filtration
2 - Deodorization

3 - Begerov
4 - Novo
5 - Instron
6 - Heroeus
7 - Shimadzu
8 - Brookfield
9 - Buchi
10 - CORNING-EEL
11 - Camspec
12 - Heidolph

Archive of SID

www.SID.ir

مدل ۳ ای-۱ [1] ساخت آلمان، رفراکتومتر رومیزی آبه [2] مدل مدل کارلزایس [3]، پمپ خلأ مستر کول ساخت امریکاودستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی پرکین – المر [4]، مدل ۲۳۸۰ ساخت امریکا.

## روشها

مراحل عملی این پژوهش در چند بخش انجام شدکه عبارتند از:آماده‌سازی نمونه‌های آزمایشی،آنالیز ترکیبات استخوان، انجام مراحل استخراج آنزیمی، خالص‌سازی محلول‌های ژلاتین حاصل و سپس تعیین راندمان استخراج، بلوم، ویسکوزیته و جذب نمونه‌هاو نهایتاً مدلینگ استخراج آنزیمی ژلاتین وپیشگویی شرایط استخراج بهترین نمونهٔ ژلاتین به لحاظ راندمان و خصوصیات عملکردی( بلوم، ویسکوزیته و رنگ )با استفاده از مدل.

## آماده‌سازی نمونه‌ها

مقدار ۳۰ کیلوگرم از استخوان‌های تهیه شده، ابتدا توسط ساتور به قطعات چند سانتیمتری خرد شده، سپس استخوان‌های خرد شده به وسیلهٔ دستگاه آسیاب چکشی به ذرات ۳-۱ میلی‌متر تبدیل شدند. پس از مخلوط کردن استخوان‌های خرد شده (به منظور همگن نمودن آنها) نمونه‌های آزمایشی ۲۰۰ گرمی استخوان، در نایلون‌های پلاستیکی بسته‌بندی شده و در سردخانهٔ زیر صفر نگهداری شدند، تا به مرور از این نمونه‌ها در آزمایشها استفاده شود(۱۳).

## آنالیز ترکیبات استخوان

ترکیب استخوان مورد استفاده در این مطالعه از نظر میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر با استفاده از روشهای زیر تعیین شد. مقدار پروتئین استخوان با استفاده از دستگاه میکرو کلدال و با در نظر گرفتن مقدار ۵/۵۵ بعنوان فاکتور تبدیل ازت به پروتئین تعیین گردید. چربی نمونه استخوان به روش سوکسله(استخراج به مدت ۶ ساعت )، مقدار رطوبت به روش وزن سنجی در آون ۱۰۰-۹۸ درجه سانتیگراد و مقدار خاکستر نمونه استخوان نیز به روش وزن سنجی (در کوره ۵۵۰ درجه سانتیگراد)اندازه‌گیری شد(۱۰).

## چربی‌گیری استخوان

عمل جداسازی چربی از استخوان خرد شده (پودر استخوان) با استفاده از آب در دو مرحله انجام گرفت. ابتدا با افزودن آب با دمای معمولی (حدود ۲۰ درجه سانتیگراد) و همزدن سریع مقادیری از چربی استخوان خارج شد، سپس در مرحلهٔ بعد با آب دارای دمای حدود ۴۰ درجه سانتیگراد این عمل دوباره تکرارشد، طی این دو مرحله قسمت اعظم چربی موجود در استخوان خارج گردید و مقدار اندک چربی باقیمانده طی مرحلهٔ دمینرالـه کردن استخوان از آن خارج شد (۸).

## دمینراله کردن استخوان

دمینراله کردن استخوان به منظور خارج کردن مواد معدنی موجود در آن انجام گرفت. روش کار بدین صورت بود که به نمونهٔ استخوان چربی‌گیری شده ( حدود ۲۰۰ گرم)، مقدار ۱۴۲۸ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک با غلظت ۵۰ گرم در لیتر اضافه شد، مخلوط حاصل به مدت دو ساعت در دمای ۸ درجه سانتیگراد هم زده شد. پس از

1 - Sigma 3E-1
2 - Abbe
3 - Carlzeiss
4 - Perkin Elmer

Archive of SID

www.SID.ir

پایان زمان دمینراله کردن، فاز محلول روی مخلوط جدا شده و اوسئین حاصل (فاز جامد) به مدت ۷ دقیقه با ۶/۲ لیتر آب مقطر شستشو گردید. استخوان دمینراله برای استخراج به‌روش آنزیمی مورد استفاده قرارگرفت (۹و ۱۱).

## استخراج به روش آنزیمی

در این روش از آنزیم نوتراز[1]، که یک پروتئاز قلیایی است استفاده شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا pH اوسئین حاصل از مرحلهٔ دمینراله کردن با افزودن محلول هیدروکسید کلسیم در pH = ۹ تنظیم شد، سپس به میزان دو برابر وزن استخوان نمونه، محلول آنزیم نوتراز با غلظت‌های ۲، ۶ و ۱۰ پی پی ام به اوسئین افزوده شد، آنگاه مخلوط حاصل در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸، ۱۲ و ۱۶ ساعت تیمار گردید. (لازم به ذکر است که pH = ۹ و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، pH و دمای بهینهٔ فعالیت آنزیم نوتراز می‌باشند). دمای مخلوط مذکور توسط هات پلیت مجهز به هم زن مغناطیسی در ۵۰ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شده و به طور مرتب هم زده می‌شد. pH نیز توسط محلول هیدروکسید کلسیم ثابت نگه داشته شد. پس از پایان تیمار آنزیمی، مخلوط مذکور به منظور غیرفعال کردن آنزیم به مدت ۱ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. سپس pH معادل ۷ تنظیم شده و عمل استخراج در دماهای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت انجام شد. پس از پایان استخراج، محلول ژلاتین توسط صافی و قیف بوخنر صاف گردید و پس از طی مراحل خالص‌سازی مورد ارزیابی کمی و کیفی قرار گرفت (۱۲و۱۳).

متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی و سطوح آنها در طرح قابل چرخش مرکب مرکزی به صورت کدبندی شده در جدول۱ ارائه شده‌اند.

## خالص‌سازی محلول ژلاتین

به محلول‌های ژلاتین حاصل از روش استخراج آنزیمی، تا رسیدن به pH = ۹، محلول هیدروکسید کلسیم با درجهٔ بومه ۶ افزوده شد. سپس با افزودن محلول سولفات آلومینیم ۲۵ درصد، pH محلول به ۷/۵ رسانده شد، آنگاه تا رسیدن به pH = 5/5، اسید فسفریک ۱۰درصد اضافه شد.

در این حالت ذرات ناخالصی در محلول ژلاتین ناپایدار شده و با سانتریفوژ کردن در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و سپس گذراندن از دو مرحله کاغذ صافی در قیف بوخنر جدا شدند. به محلول ژلاتین حاصل، به منظور بوگیری ۰/۶ گرم کربن اکتیو اضافه شده و به خوبی مخلوط گردید. سپس با سه مرحله گذراندن از کاغذ صافی در قیف بوخنر صاف گردید. محلول ژلاتین صاف شده به منظور جداسازی مواد معدنی باقی‌مانده در آن از ستون رزین تعویض یونی کاتیونی (پورولیت سی ۱۰۰) عبور داده شد. محلول ژلاتین شفاف حاصل به منظور انجام آزمایشهای کمّی و کیفی مورد استفاده قرار گرفت(۵،۱۲و۱۳).

## ارزیابی کمی و کیفی ژلاتین

### الف- تعیین راندمان استخراج

به منظور تعیین راندمان استخراج هر یک از تیمارهای استخراج به روش اسیدی و آنزیمی، از رابطه اندیس رفراکتومتری و غلظت استفاده شد. به این صورت که بریکس محلول ژلاتین خالص‌سازی شده به وسیلهٔ رفراکتومتر رومیزی آبه قرائت گردید، سپس با قرار دادن عدد بریکس در رابطهٔ زیر غلظت ژلاتین در محلول محاسبه و در ۱۰۰ گرم استخوان گزارش شد(۱۱):

1 - Neutrase

Archive of SID

www.SID.ir

بریکس × ۶/۸۱ = غلظت ژلاتین (گرم در لیتر)

**جدول ۱- متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی و سطوح آنها در طرح قابل چرخش مرکب مرکزی**

| متغیر | نماد | سطوح کدبندی شدهٔ متغیر | | |
|---|---|---|---|---|
| | | +۱ | ۰ | -۱ |
| غلظت آنزیم (پی پی ام) | $X_1$ | ۱۰ | ۶ | ۲ |
| زمان تیمار آنزیمی (ساعت) | $X_2$ | ۱۶ | ۱۲ | ۸ |
| دمای استخراج (درجه سانتیگراد) | $X_3$ | ۸۰ | ۷۰ | ۶۰ |

**ب- تعیین استحکام ژل**

اندازه‌گیری استحکام ژل حاصل از ژلاتین به روش استاندارد با استفاده از دستگاه اینستران انجام گرفت. برای تهیهٔ نمونه ژل، ابتدا یک محلول ۶/۶۷ درصد ژلاتین تهیه شد و سپس تا رسیدن به دمای ۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب داغ قرار داده شد، محلول ژلاتین به طور کامل همزده شده و به مدت ۱۷ ساعت در دمای ۰/۱ ± ۱۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از سپری شدن زمان رسیدگی ژل، استحکام ژل با استفاده از پلانجر با قطر ۱۲/۷ میلی‌متر و نفوذ ۴ میلی‌متر پلانجر به درون ژل، مقدار بلوم بر حسب گرم اندازه‌گیری شد(۲).

**ج- اندازه‌گیری ویسکوزیته**

اندازه‌گیری ویسکوزیته ژلاتین نیز به روش استاندارد و با استفاده از دستگاه ویسکومتر بروکفیلد انجام شد. ابتدا یک محلول ۶/۶۷ درصد ژلاتین تهیه گردید و در یک بشر ۶۰۰ میلی‌لیتری، توسط اسپیندل[1] شماره ۱ ویسکومتر، با میزان ۶۰ دور در دقیقه[2] مقدار ویسکوزیتهٔ محلول ژلاتین بر حسب واحد سانتی‌پوآز[3] اندازه‌گیری شد(۲و۳).

**د- ارزیابی رنگ محلول ژلاتین**

به منظور ارزیابی رنگ محلول‌های ژلاتین، میزان جذب آنها مورد اندازه گیری قرارگرفت. جذب محلول‌های ژلاتین با غلظت یک درصد در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دوپرتویی[4] اندازه‌گیری و گزارش شد (۱۳).

## طرح آزمایشی و روش آنالیز نتایج

در این پژوهش بمنظور بهینه سازی فرآیند استخراج ابتدا از روش تک فاکتوره مرسوم استفاده شد، اما به دلیل محدودیت‌های زمانی و مالی و نیز برتری‌های بهینه سازی با استفاده ازروش مدل سازی، از روش مذکور استفاده شد.آزمایشهای استخراج آنزیمی به روش کاملاً تصادفی در قالب طرح قابل چرخش مرکب مرکزی با سه تکرار درنقطه مرکزی برای ۳ متغیر و در۳ سطح انجام شدند. نتایج پژوهش با استفاده از نرم افزار آماری SAS به روش رگرسیون سطوح پاسخ[5] آنالیز شده و هر یک از متغیرهای تابع (راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب در ۴۲۰ نانومتر ) در قالب مدل رگرسیون درجه دوم زیر بصورت تابعی از متغیرهای مستقل فرآیند اسیدی $(X_1,X_2,X_3)$ ارائه شدند:

$$Y = \beta_0 + \Sigma\beta_i x_i + \Sigma\beta_{ii} x_i^2 + \Sigma B_{ij}\, x_i\, x_j$$

که $Y$ نشان دهندهٔ متغیر تابع یا پاسخ[6] است. $\beta_0$، $\beta_I$، $\beta_{ii}$، $\beta_{ij}$ ضرایب مدل رگرسیون بوده و $x_i$ و $x_j$ متغیرهای مستقل به

1 - Spindle
2 - RPM
3 - cP

4 - Double-beam
5 – Response Surface Regression
6 - Response Variable

Archive of SID

www.SID.ir

شکل کد بندی شده می‌باشند. کل مدل شامل جملات خطی
درجه دوم و حاصل ضرب‌ها[1] می‌باشد (۱):

Archive of SID

1 - Cross- Product

www.SID.ir

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{21} x_2 x_1 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{31} x_3 x_1 + \beta_{32} x_3 x_2 + \beta_{33} x_3^2$$

برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای تابع در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل نمودارهای سطوح پاسخ و کانتور[1] آنها بوسیله نرم افزار سورفر- ۷[2] ترسیم شدند. به منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش داده شده با داده‌های آزمایشی استخراج آنزیمی، عمل استخراج آنزیمی در شرایط بهینه تعیین شده صورت گرفته و نتایج ارزیابی کمی و کیفی آن با مقادیر پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید. همچنین به دلیل اهمیت بیشتر دو فاکتور استحکام ژل و ویسکوزیته در ارزیابی ژلاتین، عمل استخراج ژلاتین به روش آنزیمی در شرایط بهینه تعیین شده انجام گرفت.

## نتایج و بحث

### تجزیه ترکیبات استخوان

ترکیب استخوان مورد استفاده در این پژوهش از نظر میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در جدول ۲ ارائه شده است.

**جدول ۲- ترکیب ۱۰۰ گرم استخوان***

| ترکیبات | درصد |
|---|---|
| پروتئین | ۲۳/۵۰ ± ۱/۲۵ |
| چربی | ۱۶/۹۳ ± ۰/۳۰ |
| رطوبت | ۲۵/۵۴ ± ۰/۲۷ |
| خاکستر | ۳۴/۰۳ ± ۱/۴۳ |

نتایج میانگین سه تکرار است.

### مدل سازی استخراج آنزیمی ژلاتین

مدل رگرسیون حاصل از برازش نتایج اندازه‌گیری راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب محلول ژلاتین حاصل از استخراج آنزیمی برای هر یک از متغیرهای تابع (راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب) دارای ضرایبی می‌باشد. این ضرایب در جدول ۳ آورده شده‌اند.

نتایج آنالیز واریانس مدلهای رگرسیون راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب در استخراج آنزیمی (جداول ۴ و ۵) نشان می‌دهد که مدلهای مذکور نیز با ضرایب همبستگی به ترتیب ۰/۹۵۴، ۰/۹۹۴، ۰/۹۶۶ و ۰/۹۳۵ همگی معنی‌دار بوده و با نتایج آزمایشها به خوبی برازش داده شده‌اند. نتایج آنالیز واریانس مدلهای رگرسیون در استخراج آنزیمی نشان می‌دهند که در مدلهای رگرسیون راندمان، مقاومت ژل و ویسکوزیته، جملات خطی و درجه دوم معنی‌دار شده‌اند. در حالی که در مدل رگرسیون جذب، جملات خطی معنی‌دار بوده‌اند. بنابراین برای پیشگویی مقادیر متغیرهای تابع در سطوح مختلف متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی، می‌توان از مدلهای رگرسیون مذکور استفاده نمود.

1 - Response Surface and Contour Plot
2 - Surfer - 7

Archive of SID

www.SID.ir

**جدول ۳- ضرایب برآورد شدهٔ مدلهای رگرسیون راندمان، بلوم، ویسکوزیته و جذب در استخراج آنزیمی**

| ضریب | درجه آزادی | راندمان (درصد) $y_1$ | بلوم (گرم) $y_2$ | ویسکوزیته (سانتی پوآز) $y_3$ | جذب در ۴۲۰ نانومتر $y_4$ |
|---|---|---|---|---|---|
| $\beta_0$ | ۱ | ۱۲/۶۴۷$^{**}$ | ۲۱۸/۱۷$^{**}$ | ۴/۶۶$^{**}$ | ۰/۰۶۴۳۳$^{**}$ |
| $\beta_1$ | ۱ | ۱/۶۲۲۵$^{**}$ | ۵۷/۷۵$^{**}$ | ۰/۰۷۱۲۵ | ۰/۰۱۲۷۵$^{**}$ |
| $\beta_2$ | ۱ | ۱/۳۲۶۲۵$^{**}$ | ۷/۵۶۲$^{**}$ | ۰/۶۶۵$^{**}$ | ۰/۰۰۸۳۷۵$^{*}$ |
| $\beta_3$ | ۱ | ۰/۴۴۳۷۵ | ۴/۹۳۷$^{*}$ | ۰/۳۸۱۲۵$^{**}$ | ۰/۰۰۵۱۲۵ |
| $\beta_{11}$ | ۱ | -۲/۷۱۳۳$^{**}$ | -۲۹/۸۸۳$^{**}$ | -۰/۴۷۱۲۵$^{**}$ | -۰/۰۱۰۱۷$^{*}$ |
| $\beta_{21}$ | ۱ | ۰/۴۸۲۵ | -۱۴/۳۲۵$^{**}$ | -۰/۰۴۵ | ۰/۰۰۳۲۵ |
| $\beta_{22}$ | ۱ | -۰/۲۹۵۸۳ | -۱۵/۹۰۸$^{**}$ | -۰/۳۶۴$^{**}$ | -۰/۰۰۷۴۱۷ |
| $\beta_{31}$ | ۱ | ۰/۲۱۲۵ | -۲/۷۷۵ | -۰/۳۴۲۵$^{**}$ | ۰/۰۰۱۲۵ |
| $\beta_{32}$ | ۱ | ۰/۰۹ | -۱/۶ | ۰/۱۰۵$^{*}$ | ۰/۰۰۳ |
| $\beta_{33}$ | ۱ | -۰/۰۳۰۸۳ | -۱۹/۶۵۸$^{**}$ | -۰/۲۲۶۲۵$^{**}$ | -۰/۰۰۰۹۱۷ |

**جدول ۴- آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر روی مدلهای رگرسیون در استخراج آنزیمی**

| متغیر | درجه آزادی | مجموع مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | راندمان (٪) | بلوم (گرم) | ویسکوزیته (سانتی پوآز) | جذب در ۴۲۰ نانومتر |
| غلظت آنزیم ($x_1$) | ۴ | ۴۹/۳۵۵۳$^{**}$ | ۳۰۸۲۹$^{**}$ | ۱/۳۳۸$^{**}$ | ۰/۰۰۱۷۳$^{**}$ |
| زمان ($x_2$) | ۴ | ۱۵/۳۵۸۳$^{*}$ | ۲۲۲۳/۰۲۵$^{**}$ | ۴/۰۷۸۵$^{**}$ | ۰/۰۰۰۸۴۲$^{*}$ |
| دما ($x_3$) | ۴ | ۱/۷۹۱۸۵ | ۱۶۶۲/۹۷$^{**}$ | ۱/۸۶۵$^{**}$ | ۰/۰۰۰۲۵۵ |

**جدول ۵- آنالیز واریانس رگرسیون راندمان، بلوم، ویسکوزیته و جذب در استخراج آنزیمی**

| منابع تنوع | درجه آزادی | مجموع مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | راندمان (٪) $y_1$ | مقاومت ژل(گرم) $y_2$ | ویسکوزیته (سانتی‌پوآز) $y_3$ | جذب در ۴۲۰ نانومتر $y_4$ |
| خطی | ۳ | ۳۶/۷۰۶۹$^{**}$ | ۲۷۳۳۳$^{**}$ | ۴/۷۴۱۲$^{**}$ | ۰/۰۰۲۰۷۲$^{**}$ |
| درجه دوم | ۳ | ۲۷/۳۳۸۲$^{**}$ | ۴۹۸۷/۸۳۴$^{**}$ | ۱/۳۲۲$^{**}$ | ۰/۰۰۰۵۴۶ |
| حاصلضربها | ۳ | ۱/۱۴۴۲۵ | ۸۶۱/۸۶۵$^{**}$ | ۰/۵۲۱۴$^{**}$ | ۰/۰۰۰۰۸۴۵ |
| مدل | ۹ | ۶۵/۱۸۹۳$^{**}$ | ۳۳۱۸۳$^{**}$ | ۶/۵۸۴۶$^{**}$ | ۰/۰۰۲۷۰۲$^{*}$ |
| ضریب همبستگی | | ۰/۹۵۲۶ | ۰/۹۹۸ | ۰/۹۵ | ۰/۹۳۵ |

** High Significance
* Significance

Archive of SID

www.SID.ir

## مدل رگرسیون راندمان

آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر روی مدل رگرسیون راندمان استخراج آنزیمی ژلاتین نشان می‌دهد که فقط متغیرهای غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی معنی‌دار شده‌اند. همچنین ضریب همبستگی راندمان با متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی (جدول ۷) نشانگر اینست که اثر غلظت آنزیم بر راندمان بیش از اثر زمان تیمار آنزیمی می‌باشد. این امر به دلیل تأثیر حضور محدود آنزیم در برابر سوبسترا می‌باشد بطوریکه به دلیل محدود بودن غلظت آنزیم، افزایش زمان تیمار آنزیمی نیز نمی تواند به اندازه غلظت آنزیم بر افزایش فعالیت آنزیمی تاثیر بگذارد. همچنین اثر زمان تیمار آنزیمی بر افزایش راندمان نیز بیش از اثر دمای استخراج می‌باشد.

**جدول ۶- آنالیز باقیمانده‌های مدلهای رگرسیون راندمان، بلوم، ویسکوزیته و جذب ژلاتین استخراج آنزیمی**

| منابع تنوع | درجه آزادی | مجموع مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | راندمان (٪) | مقاومت ژل (گرم) | ویسکوزیته (سانتی‌پوآز) | جذب در ۴۲۰ نانومتر |
| عدم برازش | ۳ | ۳/۲۲۹۲* | ۶۴/۹۸۷* | ۰/۰۱۷۱ | ۰/۰۰۰۱۳۷ |
| خطای خالص | ۲ | ۰/۰۱۴۴۷ | ۱/۰۸۶۷ | ۰/۰۱۵۸ | ۰/۰۰۰۰۵۱ |
| خطای کل | ۵ | ۳/۲۴۳۷ | ۶۶/۰۷۴ | ۰/۰۳۲۹ | ۰/۰۰۰۱۸۸ |

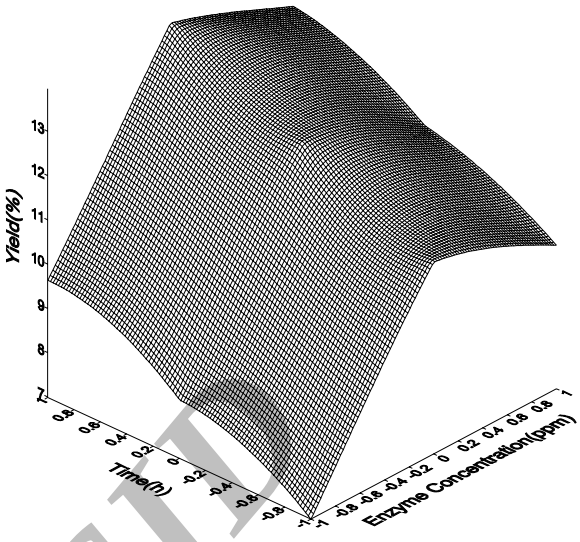
**جدول ۷- ضرایب همبستگی میان متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی و متغیرهای تابع**

| متغیر | ضریب همبستگی | | | |
|---|---|---|---|---|
| | راندمان (٪) | مقاومت ژل (گرم) | ویسکوزیته (سانتی پوآز) | جذب در ۴۲۰ نانومتر |
| غلظت آنزیم | ۰/۵۵۵ | ۰/۶۰۶ | ۰/۰۷۸ | ۰/۶۷۱ |
| زمان تیمار آنزیمی | ۰/۴۵۳ | ۰/۳۲۱ | ۰/۷۳۱ | ۰/۴۴۱ |
| دمای استخراج | ۰/۱۵۲ | -۰/۷۵۰۵ | ۰/۴۲ | ۰/۲۷۰ |

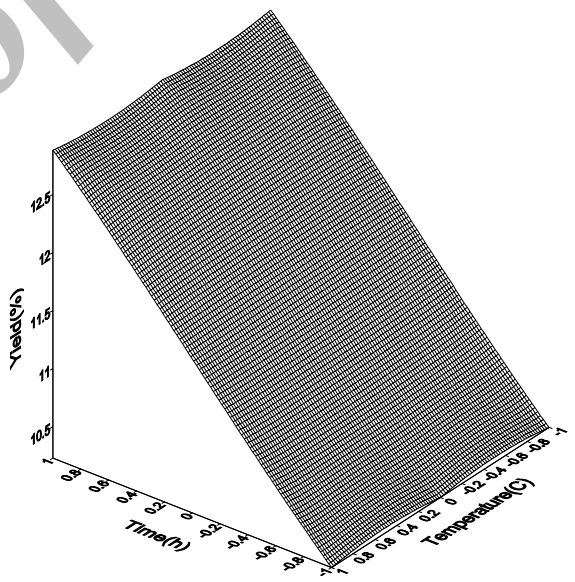
روند تغییرات راندمان استخراج آنزیمی با متغیرهای غلظت آنزیم، زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج در شکلهای ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند. در این نمودارها عدم تأثیردمای فرایند بر روی راندمان استخراج آنزیمی مشاهده می‌شوند. این نمودارها همچنین نشان می‌دهند که با افزایش غلظت آنزیم تا حد مشخصی (غلظت ۶ پی پی ام) در کمترین زمان تیمار آنزیمی، راندمان استخراج ژلاتین افزایش می‌یابد، اما پس از آن مقدار راندمان تقریباً ثابت می‌شود. در حالی که با افزایش زمان تیمار آنزیمی، افزایش غلظت آنزیم نیز سبب افزایش راندمان استخراج می‌شود.تأثیر غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی بر روی افزایش راندمان به دلیل هیدرولیز بیشتر پیوندهای پپتیدی زنجیره‌های کلاژن و شکستن آنها به زنجیره‌هایی با وزن ملکولی کمتر می‌باشد (۱۳).

Archive of SID

www.SID.ir



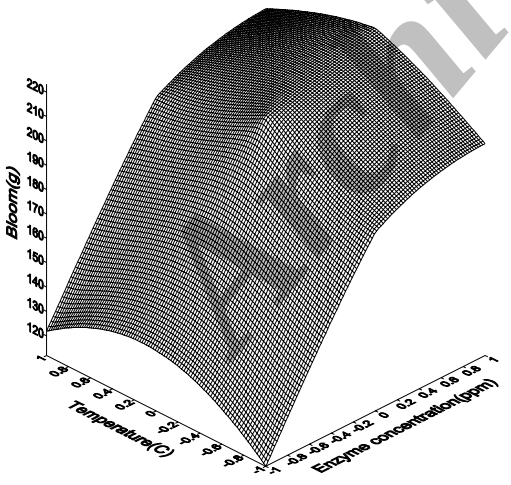

**شکل ۱- نمودار سطح پاسخ راندمان استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی**




**شکل ۲- نمودار سطح پاسخ راندمان استخراج آنزیمی در مقابل زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج.**

## مدل رگرسیون مقاومت ژل

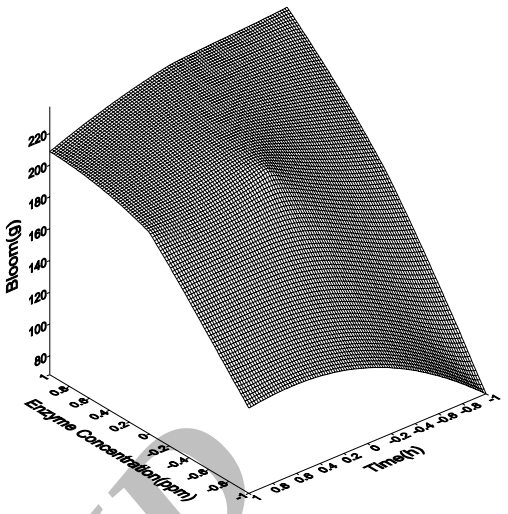
آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی بر روی مدل رگرسیون استحکام ژل نشان می‌دهد که اثر هر سه متغیر غلظت آنزیم، زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج معنی‌دار شده‌اند (جدول۴). ضرایب همبستگی متغیرهای فرایند با میزان استحکام ژل (جدول ۷) نشان می‌دهد که اثر دمای استخراج بر روی میزان مقاومت ژل بیش از اثر غلظت آنزیم است. همچنین اثر غلظت آنزیم بیش از اثر زمان تیمار آنزیمی می‌باشد. روند تغییرات مقدار مقاومت ژل در استخراج آنزیمی در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده‌اند. در غلظت‌های پائین آنزیم (۲ پی پی ام)، اثر زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج بر روی میزان مقاومت ژل کم است، اما با افزایش غلظت آنزیم، این دو متغیر نیز زیاد می‌شود. با افزایش غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی به دلیل افزایش مقدار مولکولهای ژلاتین به فرم آلفا، مقدار مقاومت ژل افزایش می‌یابد. اما دماهای بالا (بیش از ۷۰ درجه سانتیگراد) دارای اثر معکوس بر مقدار استحکام ژل می‌باشند این پدیده نیز بدلیل تاثیر دماهای بالا در کاهش مقدار مولکولهای ژلاتین به فرم آلفا می‌با شد(۲و ۱۳).




**شکل ۳- نمودار سطح پاسخ مقاومت ژل استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم و دمای استخراج**

Archive of SID

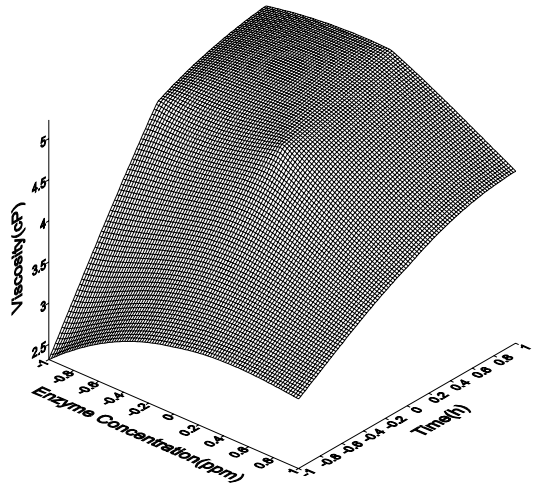
www.SID.ir



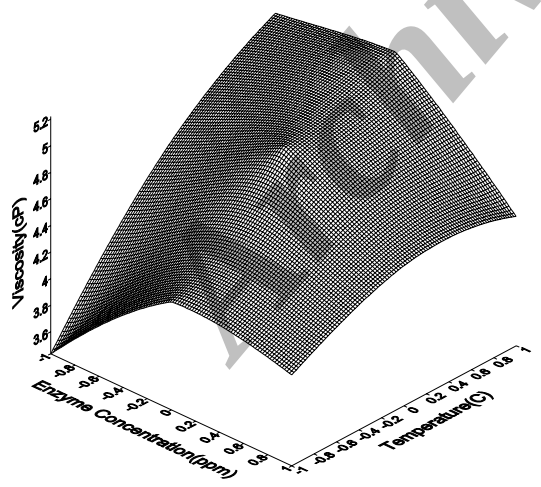

**شکل ۴- نمودار سطح پاسخ مقاومت ژل استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی.**

## مدل رگرسیون ویسکوزیته

آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی بر مدل رگرسیون نشان می‌دهد که اثر هر سه متغیر غلظت آنزیم، زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج در مدل معنی‌دار شده است (جدول ۴). ضرایب همبستگی متغیرهای فرایند با ویسکوزیته (جدول ۷) نشانگر اینست که اثر زمان تیمار آنزیمی بر روی مقدار ویسکوزیته ژلاتین حاصل بیش از اثر دمای استخراج می‌باشد. همچنین اثر دمای استخراج بیش از اثر غلظت آنزیم است. روند تغییرات ویسکوزیته در استخراج آنزیمی، در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. شکل‌های ۵ و ۶ نشان می‌دهند که در غلظت‌های پائین آنزیم (۲ پی پی ام) اثر متغیرهای زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج بر روی افزایش میزان ویسکوزیته خیلی زیاد است، اما با افزایش غلظت آنزیم اثر متغیرهای مذکور کاهش می‌یابد. افزایش غلظت آنزیم از حدود ۶/۸ پی پی ام به بالا سبب کاهش ویسکوزیتهٔ محلول ژلاتین می‌شود. این پدیده به علت فعالیت زیاد آنزیمی و هیدرولیز ژلاتین و در نتیجه کاهش زنجیره‌های با وزن ملکولی بالا (HMW) رخ می‌دهد (۲ و ۵).




**شکل ۵- نمودار سطح پاسخ ویسکوزیته استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی**



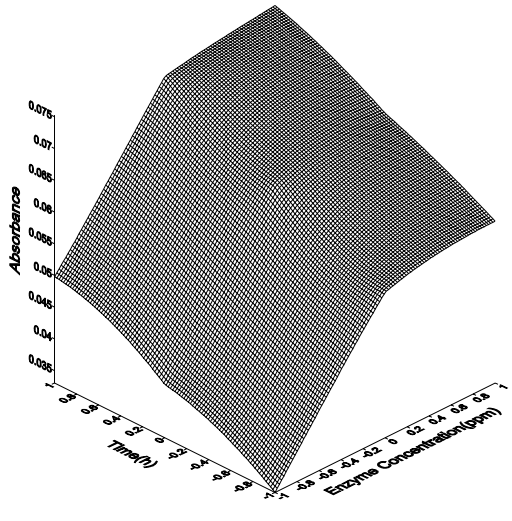

**شکل ۶- نمودار سطح پاسخ ویسکوزیته استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم و دمای استخراج.**

Archive of SID

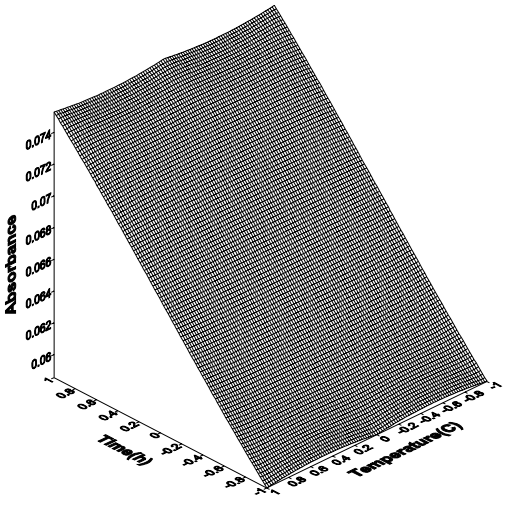
www.SID.ir

## مدل رگرسیون جذب پرتو

آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر مدل رگرسیون جذب پرتو نشان می‌دهد که تنها اثر دو متغیر غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی در مدل معنی‌دار شده است. همچنین ضرایب همبستگی میان متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی و میزان جذب پرتو (جدول ۷) نشان می‌دهد که اثر متغیر غلظت آنزیم بر روی میزان جذب پرتوی محلول ژلاتین بیش از اثر زمان تیمار آنزیمی است. روند تغییرات میزان جذب پرتوی محلول ژلاتین حاصل از استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم، زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج در شکل‌های ۷ و ۸ ارائه شده‌اند. شکل ۸ به خوبی نشان می‌دهند که دمای استخراج تأثیر زیادی بر روی میزان جذب پرتوی محلول ژلاتین ندارد. واضح است که با افزایش غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی به دلیل تولید طیفی از ملکولهای ژلاتین با وزن مولکولی خاص که دارای جذب پرتوی بیشتری می‌با شند، میزان جذب محلول ژلاتین نیز افزایش می‌یابد.




**شکل ۷- نمودار سطح پاسخ جذب پرتو استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی**




**شکل ۸- نمودار سطح پاسخ جذب پرتو استخراج آنزیمی در مقابل دمای استخراج و زمان تیمار آنزیمی.**

## تعیین نقطه اپتیمم استخراج آنزیمی

مدلهای رگرسیون راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب، بسته به نوع و درجهٔ مدل دارای نقاط سکون می‌باشند. از آنجا که مقدار اپتیمم برای هر یک از متغیرهای تابع مذکور بسته به نوع متغیر متفاوت است، از این رو نمی‌توان فقط از روی نقاط سکون مدلهای رگرسیون، نقاط اپتیمم را یافت(۶). سطوح پیشگوئی شدهٔ متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی برای نقاط سکون مدلهای رگرسیون راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب پرتو در جدول ۸ ارائه شده‌اند. بنابراین می‌توان با انطباق نمودارهای کانتور متغیرهای تابع فوق، نقطهٔ اپتیمم را به صورت ترسیمی به دست آورد. مقادیر متغیرهای فرایند استخراج در نقطهٔ اپتیمم ترسیمی عبارتند از: الف- راندمان : غلظت آنزیم ۶/۱ppm، زمان h ۱۵/۶، دمای $^{\circ}C$ ۷۰ . ب- مقاومت ژل : غلظت آنزیم ۹/۱ppm، زمان h ۱۱/۹، دمای $^{\circ}C$ ۷۰/۳ . ج- ویسکوزیته: غلظت آنزیم ppm ۷/۸۶، زمان h ۱۴/۹، دمای $^{\circ}C$ ۷۷/۵ . د- جذب پرتو : غلظت آنزیم ppm ۲/۸، زمان h ۱۰، دمای $^{\circ}C$ ۶۰ .

Archive of SID

www.SID.ir

**جدول ۸- سطوح پیشگویی شدهٔ متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی، برای مقادیر اپتیمم متغیرهای تابع**

| متغیرهای فرایند | سطوح متغیرهای فرایند برای مقادیر اپتیمم | | | |
|---|---|---|---|---|
| | راندمان (٪) | مقاومت ژل (گرم) | ویسکوزیته (سانتی‌پوآز) | جذب در ۴۲۰ نانومتر |
| غلظت آنزیم ($x_1$) | ۱/۹۶۷۴ | ۰/۵۴۰۳ | -۰/۵۳۰ | ۱/۵۱۲۳ |
| زمان تیمار آنزیمی ($x_2$) | ۷/۶۷۶ | -۰/۴۲۲ | ۱/۱۶۵۴ | ۲/۴۹۵۹ |
| دمای استخراج ($x_3$) | ۲۵/۱۷۸ | -۲/۵۴۶ | ۱/۵۱۴ | ۷/۹۱۱ |
| مورفولوژی | ماکزیمم | نقطه زینی | ماکزیمم | ماکزیمم |

## تایید مدل[1]

نتایج مقایسه میانگین ویژگیهای ژلاتین تولیدی به روش آنزیمی در شرایط بهینه با مقادیر پیشگویی شده توسط مدلهای رگرسیون در سطح احتمال ۹۵ درصد نشان داد که اختلاف معنی داری میان آنها وجود نداشته و بنابراین صحت مدل‌های مذکور مورد تایید می‌باشد.

## نتیجه‌گیری و پیشنهادات

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که می‌توان فرآیند استخراج آنزیمی را با روش رگرسیون سطوح پاسخ (RSREG) مدل سازی نمود. ضرایب همبستگی مدل‌های رگرسیون برازش داده شده راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب در فرآیند آنزیمی به ترتیب نشان داد که مدل‌ها بخوبی با داده‌های آزمایشی برازش داده شده اند. همچنین نتایج انجام آزمایش بمنظور تایید مدل، صحت مدل‌ها را تایید نمود. با توجه به مصارف گسترده ژلاتین خوراکی در بخشهای مختلف صنایع غذایی کشورمان که هر ساله افزایش می‌یابد و واردات این محصول که سبب خروج مقادیر زیادی ارز از کشور می‌شود، پیشنهاد می‌شود که روشهای اسیدی و آنزیمی به منظور ایجاد شرایط تولید صنعتی ژلاتین غذایی در مقیاس نیمه صنعتی مورد ارزیابی قرار بگیرند. از آنجا که شرایط مختلف استخراج سبب ایجاد توزیع‌های متفاوتی در وزن ملکولی ژلاتین می‌شود، و از طرف دیگر چون توزیع وزن مولکولی ژلاتین حاصل از استخراج بر روی خصوصیات عملکردی ژلاتین تاثیر دارد، بنابراین پیشنهاد می‌شود تحقیقاتی به منظور مدلینگ رابطه میان شرایط استخراج، خصوصیات عملکردی و توزیع وزن ملکولی در دو روش اسیدی و آنزیمی صورت گیرد. ترکیب و نوع ماده اولیه حاوی کلاژن (پوست، استخوان و بافتهای پیوندی ) و حتی سن دامی که ماده اولیه از آن استحصال شده، بر شرایط و شدت فرآیند استخراج تاثیر می‌گذارند. بنابراین پیشنهاد می‌شود مدلینگ فرآیند استخراج آنزیمی بر روی مواد اولیه مختلف انجام شود.

1 - Verification

Archive of SID

www.SID.ir

**منابع :**


۱. رضایی،ع.م.،ا.سلطانی،۱۳۷۷، مقدمه ای بر تحلیل رگرسیون کاربردی، مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۹۴-۱۶۷ .

2. Francis, F. J., 2000. Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology. John wiley and Sons, Inc., New York.
3. Helrich, K., 1990. Official Methods of analysis of the Association of official analysis chemists, 15th edition, Published by Association of official analysis chemists, Inc., Virginia(USA).
4. Herrmann, P., 1979. Production of gelatine from cattle bones. *Food Engineering International.* Vol. 4, No. 9, PP. 41-49.
5. Holzer, D., 1996. Gelatin production, *US Patent, PN. 5,484,888.*
6. Hu, R., 1999. Food product design. Technomic publishing company, Inc., USA.
7. Imeson, A., 1997. Thickening and Jelling agents for Food. Second edition Chapman & Hall, UK.
8. Jones, R. T., 1970. Pharmaceutical Gelatin- Manufacture. *Process Biochemistry,* Vol. 5, pp. 17-23.
9. Moy, J. and G.Takerkart , 1995. Continuous process for the preparation of Gelatin from powdered bone, and gelatin obtained. *US patent, PN. 5,459,241.*
10. Nasrallah, M. and P.Ghossi, 1993. Extraction process for gelatin. *US Patent, PN. 5, 210, 182.*
11. Nicolas- Somonnot, M. O., V. Tregur, J. P Leclerc., M. Sardin, J.P. Brajoux, J.Moy and G.Takerkart, 1997. Experimental study and modelling of gelatin production from bone powder: elaboration of an overall kinetic schme for the acid process. *Chemical Engineering Journal,* Vol. 67, pp. 55-64.
12. Petersen, B.R. and J.R.Yates, 1977. Gelatin extraction. US *patent, PN. 4,064,008.*
13. Rowlands, A.G. and D.J.Burrows, 2000. Enzyme method of mamufacturing gelatin. *US patent, PN. 6, 100, 381.*
14. Shreve, R. N. and J.A. Brink, 1977. Chemical Process Industries. foorth edition, McGraw-Hill , New York.


Archive of SID

www.SID.ir

# Optimization of Enzymic Extraction of Edible Gelatin from Cattle Bones Using Response Surface Methodology (RSM)

**S. H. Hosseiniparvar[33]*, J. Keramat[34], M. Kadivar[2], E. Khanipour[35], E. Milani[36]**

## Abstract

Gelatin is a protein hydrocolloid. Because of its unique characteristics such as gel forming, thickening, stabilizing, emulsifiing, foam and film forming, is widely used in food industries. In this research, in order to optimize the factors which affect enzymatic extraction method of gelatin ,the effects of three variables, enzyme concentrations(2-10 ppm), time(8-16 hours) and temperature(60-80 ˚C) on the yield of extraction, gel strength, viscosity and absorption in 420 nm were investigated. The rotatable central composite experimental design was used, and the data were analyzed by using of response surface regression(RSREG).Correlation coefficients of fitted regression models of yield, gel strength, viscosity and absorption for enzyme extraction method were determined as 0.953 , 0.998 , 0.995 and 0.935 , respectively.Analysis of variance for the overall effects of process variables in enzymatic extraction method on regression models showed that the enzyme concentration, the time of enzyme treatments and temperature had significant effects on gel strength and viscosity regression models, however the effect of temperature on both yield and absorption regression models was not significant($p > 0.05$).The optimum conditions obtained from response surface regression models in enzymatic extraction method for yield, gel strength, viscosity and absorption which were verified experimentalls were (6.1 ppm, 15.6 hours, 70 ˚C), (9.1 ppm, 11.9 hours, 70.3 ˚C), (7.86 ppm, 14.9 hours, 77.5 ˚C) and (2.8 ppm, 10 hours, 60 ˚C), respectively.

**Key words: gelatin, enzymatic extraction, response surface optimization**

33- PhD Student of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad. *. Corresponding Author:
E-mail:hosseiniparvar@yahoo.com
34- Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology.
35- Department of Food Science and Technology, Azad Islamic University, Ayatollah Amoli Branch.
36- Former Msc. student, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture. Department of Food Science and Technology.

Archive of SID

www.SID.ir