

## بهینه‌سازی فرایند استخراج ژلاتین، از ضایعات پوست گوسفند با استفاده از آنزیم آلکالاز به روش سطح پاسخ

مهدی زارعی<sup>۱</sup>، مصطفی مظاهری تهرانی<sup>۲\*</sup>، حسن رشیدی<sup>۳</sup>، محسن فتحی نجفی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

\* نویسنده مسئول (mmazaheri@um.ac.ir)

۳- استادیار، گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۴- استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی - شعبه مشهد، مشهد، ایران

### چکیده

در این تحقیق، شرایط بهینه استخراج آنزیمی ژلاتین از ضایعات پوست گوسفند با استفاده از اثر سه متغیر، غلظت آنزیم (۲/۵-۰/۵ درصد)، زمان هیدرولیز (۶۰-۲۴۰ دقیقه) و دمای استخراج (۶۰-۸۰ درجه سانتی‌گراد) تعیین شد. اثر این سه متغیر بر بازده استخراج، استحکام ژل، ویسکوزیته، درجه هیدرولیز، نقطه ذوب و تعیین الگوی الکتروفورز بررسی شد و نتایج حاصل با کمک طرح آزمایشی مرکب مرکزی به روش سطح پاسخ، تجزیه و تحلیل شدند. فاکتور عدم برازش نیز برای تمامی صفات مذکور در سطح ۹۵ درصد معنی‌دار نبود. براین اساس معلوم شد که دمای استخراج ۶۰ درجه سانتی‌گراد، با ۰/۵ درصد غلظت آنزیم و ۱۶۶ دقیقه زمان هیدرولیز، شرایط مطلوبی برای به دست آوردن بیشترین بازده استخراج (۱۱/۰۳ درصد) و بهترین درجه هیدرولیز (۲۳ درصد) است. علاوه بر این، اثر این سه متغیر روی ویسکوزیته، استحکام ژل و نقطه ذوب نیز معنی‌دار بود و در شرایط بهینه، استحکام ژل ۱۷۵/۳۳ گرم، ویسکوزیته ۳/۲۶ میلی‌پاسکال بر ثانیه و نقطه ذوب ۲۵/۳۹ درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۳۰

### واژه‌های کلیدی

استخراج آنزیمی

ژلاتین

سطح پاسخ

ضایعات پوست گوسفند

### مقدمه

ژلاتین یکی از پر مصرف‌ترین مواد پروتئینی است که از هیدرولیز جزئی مواد خام کلاژن‌دار پوست، استخوان و بافت‌های پیوندی حیوانات به دست می‌آید (Mad-Ali, Benjakul, Prodpran, & Maqsood, 2017; Mulyani, Setyabudi, Pranoto, & Santoso, 2017). ژلاتین کاربردهای غذایی و غیر غذایی (دارویی، عکاسی، آرایشی-بهداشتی و ریزپوشینه‌کردن طعم‌ها) زیادی دارد. عواملی چون سن حیوان، منبع ماده خام، پیش‌عملیات و روش استخراج، بر ویژگی‌های ژلاتین (استحکام ژل و نقطه ذوب) تأثیر دارد (Lassoued et al., 2014; Mad-Ali, Benjakul, & Maqsood, 2016b). به‌طور کلی، چهار روش برای استخراج ژلاتین وجود دارد: روش‌های اسیدی، قلیایی، آنزیمی و پراکسید هیدروژن. استفاده از آنزیم در فرایند تولید ژلاتین، علاوه بر مقرون‌به‌صرفه بودن از نظر اقتصادی، نیاز به مواد شیمیایی را کاهش داده و زمان فرایند استخراج را نیز کوتاه‌تر می‌کند. یکی از عوامل گوناگون مؤثر در انتخاب آنزیم‌ها، محدوده فعالیت آنزیم و کارایی مطلوب آن است. آلکالاز<sup>۱</sup> آنزیمی قلیایی است که از پروتئاز یک باکتری پر کاربرد در هیدرولیز پروتئین‌ها، به نام باسیلوس

ژلاتین یکی از پر مصرف‌ترین مواد پروتئینی است که از هیدرولیز جزئی مواد خام کلاژن‌دار پوست، استخوان و بافت‌های پیوندی حیوانات به دست می‌آید (Mad-Ali, Benjakul, Prodpran, & Maqsood, 2017; Mulyani, Setyabudi, Pranoto, & Santoso, 2017). ژلاتین کاربردهای غذایی و غیر غذایی (دارویی، عکاسی، آرایشی-بهداشتی و ریزپوشینه‌کردن طعم‌ها) زیادی دارد. عواملی چون سن حیوان، منبع ماده خام، پیش‌عملیات و روش استخراج، بر ویژگی‌های ژلاتین (استحکام ژل و نقطه ذوب) تأثیر دارد (Lassoued et al., 2014; Mad-Ali, Benjakul, & Maqsood, 2016b).

<sup>1</sup> Alcalase

این محققان pH را عاملی مؤثر در ویسکوزیته ژلاتین می‌دانستند و ویسکوزیته ژلاتین نیز در pH بهینه هیدرولیز کلاژن افزایش یافت. در تحقیقی دیگر، Talapphet و همکاران (۲۰۱۷) بهینه‌سازی فرایند استخراج و ویژگی‌های ژلاتین استخراج‌شده از پوست دباغی‌شده گاو را بررسی کردند، که با استفاده از روش پیش‌عملیات اسیدی و هیدرولیز حرارتی ژلاتین به‌دست آوردند. ژلاتین استخراج‌شده دارای استحکام ژل و ویسکوزیته کمتری نسبت به ژلاتین پوست گاو بود. آنها علت را مقدار کم پروتئین و حضور پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین اعلام کردند که بر اثر هیدرولیز زنجیره پروتئینی در طول فرایند آهک‌زنی پوست در پوست دباغی‌شده به‌وجود آمده‌اند.

باتوجه‌به‌اینکه درحال‌حاضر، اطلاعات کمی درمورد تولید ژلاتین از پوست گوسفند موجود است، هدف از انجام این تحقیق، بهینه‌سازی فرایند استخراج آنزیمی ژلاتین از ضایعات پوست گوسفند با استفاده از روش سطح پاسخ است و بررسی خصوصیات چگون استحکام ژل، ویسکوزیته، بازده استخراج، درجه هیدرولیز و الگوی الکتروفورز روی ژلاتین تولید شده است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

ضایعات پوست گوسفند از شرکت صنایع چرم آریا، آنزیم پروتئاز آلکالاز از شرکت نووو و تمام مواد شیمیایی موردنیاز این تحقیق از شرکت مرک آلمان تأمین شده است.

### تعیین فعالیت آنزیم آلکالاز

آنزیم فوق با استفاده از هیدرولیز کازئین به‌عنوان سوبسترا جهت تعیین فعالیت مشخص گردید. ابتدا مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از پودر آنزیم ۱ درصد را در بافر فسفات حل نموده و با مقدار ۰/۹ میلی‌لیتر از کازئین ۰/۵ درصد مخلوط و گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس با استفاده از تری‌کلرواستیک‌اسید واکنش متوقف و بعد از سانتریفیوژ کردن محلول به‌مدت ۱۵ دقیقه، جذب در ۲۸۰ نانومتر انجام گردید.

لیچنفورمیس<sup>۱</sup> به‌دست می‌آید. این باکتری توانایی زیادی در هیدرولیز پروتئین‌های غیراختصاصی دارد. دامنه فعالیت آن نیز در pH=۸-۱۰ و محدوده دمایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد است که احتمال آلودگی‌های میکروبی را در طی فرایند تولید کاهش می‌دهد (Salwane, Mustapha, Mamot, Maskat, & Ibrahim, 2013; See, Hoo, & Babji, 2011). استفاده از اسید در پیش‌عملیات نیز سبب تجزیه جزئی پیوندهای بین‌زنجیره‌ای اسیدهای آمینه و سست شدن پیوندهای بین‌مولکولی و درون‌مولکولی کلاژن پوست می‌شود (Mad-Ali, Benjakul, Prodpran, & Maqsood, 2016a). دلیل استفاده از قلیا در پیش‌عملیات، حذف مواد پروتئینی غیرکلاژنی از فرایند تولید است. استفاده از کلروفورم به‌منزله حلال نیز در کاهش چربی پوست بسیار مفید است (Talapphet, Prommajak, & Raviyan, 2017). گزارش‌ها نشان می‌دهند ایران با سهم ۲/۶ درصد از دام‌های جهان، ۲/۳ درصد از کل پوست جهان را در اختیار دارد. از این مقدار، سالانه حدود ۱ میلیون جلد پوست گوسفند در صنعت پوست کشور به چرم تبدیل می‌شود و در طی این فرایند تبدیل، ۲۰ درصد آن به‌صورت ضایعات هدر می‌رود. از این مقدار ضایعات می‌توان ۱۵-۱۲ درصد ژلاتین به‌دست آورد (Tehran Chamber of Commerce, Industries, Mines and Agriculture, 2017). بنابراین ضایعات در صنعت پوست می‌تواند جایگزین مناسبی برای منابع حاوی کلاژن در تولید ژلاتین باشد. بدین‌طریق، هزینه‌های دفع نیز در این صنعت کاهش می‌یابد (ShahiriTabarestani, Maghsoudlou, Xu, Motamedzadegan, & Sadeghi Mahoonak, 2010). همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که در استخراج ژلاتین از پوست ماهی با استفاده از آنزیم، پیش‌عملیات قلیایی و استون (حلال چربی پوست)، با افزایش زمان هیدرولیز، بازده محصول و توزیع وزن مولکولی افزایش می‌یابد. Mulyani و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از پیش‌عملیات قلیایی و اسیدی و هیدرولیز حرارتی، از پوست بوفالو ژلاتینی استخراج کردند که ۱۴/۶۷ درصد تا ۲۹/۱۷ درصد بازده استخراج داشته است. ژلاتین استخراج‌شده زنجیره‌های طولانی‌تری داشته است، بنابراین بازه استحکام ژل ۲۳۹/۴۴ گرم تا ۲۹۳/۴۱ گرم اعلام شد، اما ویسکوزیته به‌دست‌آمده از ژلاتین تولیدشده ۱۶/۳۷ تا ۲۲/۱۷ پاسکال بر ثانیه بود.

<sup>1</sup> Bacillus licheniformis

## روش تولید ژلاتین

استخراج ژلاتین در این پژوهش براساس روش Lassoued و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییر انجام شد. ضایعات پوست گوسفند به آزمایشگاه منتقل و پس از شش‌زدنی، به قطعه‌هایی در ابعاد ۵ میلی‌متری تبدیل و تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شدند. پوست‌ها را قبل از فرایند تولید، به دمای محیط رسانده، سپس برای متورم کردن و شست‌وشوی بهتر، به مدت ۳۰ دقیقه با نسبت ۱:۵ در آب مقطر غوطه‌ور شدند. پس از آب‌کشی، آنها را به نسبت ۱:۵ با کلروفورم مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند. پس از چربی‌زدایی کامل، کلروفورم را از مخلوط حذف و پوست‌ها شست‌وشو شدند. برای حذف پروتئین‌های غیرکلاژنی، از محلول سود (NaOH) و برای شکستن زنجیره‌های بین‌مولکولی از اسید استفاده شد. عملیات استخراج ژلاتین با کمک آنزیم آلکالاز (pH=۸/۵) با غلظت‌ها (۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ درصد)، زمان‌ها (۶۰، ۱۵۰ و ۲۴۰ دقیقه) و دماهای (۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد) موردنظر در طول ۳ ساعت انجام شد. محلول ژلاتین به‌دست‌آمده را با کمک صافی با مش ۱۰۰ صاف و تا خشک‌شدن کامل، در پلیت‌های مخصوص و آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

## خصوصیات فیزیکوشیمیایی پوست

میزان پروتئین نمونه پوست با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری پروتئین میکروکلدال ((شرکت بوخی، ساخت سوئد)) (شامل بخش‌های هضم و تقطیر)) طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۴۷۴ (Institute of Standards and Industrial Research of Iran [ISIRI], 1994) اندازه‌گیری شد؛ چربی پوست به‌روش سوکسله و طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۴۷۴ (ISIRI, 1994) مشخص گردید؛ مقدار رطوبت نمونه را به‌روش وزنی و با قراردادن آن در آون (مدل UFB400، شرکت ممرت، ساخت آلمان) و میزان خاکستر را نیز با قراردادن در کوره (مدل F2L 1500، شرکت ویک استار، ساخت انگلستان) و باتوجه‌به روش استاندارد ملی ایران به شماره ۳۴۷۴ (ISIRI, 1994) اندازه‌گیری شد. در این آزمون‌ها در صورت نیاز، از ترازوی آزمایشگاهی (مدل جی‌آر، شرکت اند، ساخت ژاپن) با دقت  $\pm 0.0001$  استفاده شد.

## بازده استخراج

بازده استخراج هر یک از نمونه‌های تولیدشده با استفاده از اندیس رفرکتومتری (رفرکتومتر رومیزی آبه مدل توواج، ساخت چین) انجام شد. غلظت (بریکس) محلول صاف‌شده ژلاتین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با رفرکتومتر تعیین و با قراردادن عدد قرائت‌شده در رابطه (۱)، غلظت ژلاتین در محلول محاسبه شد ( Hosseiniparvar, Keramat, (Kadivar, Khanipour, & Milani, 2006).

رابطه (۱)

بریکس  $\times 6/81 =$  غلظت ژلاتین (گرم در لیتر)

سپس با قراردادن اعداد مربوط به غلظت ژلاتین در رابطه (۲)، میزان بازده استخراج ژلاتین به‌دست آمد:

رابطه (۲)

$$Yield = \frac{(C \times V)}{M} \times 100$$

در رابطه (۲)، C غلظت ژلاتین تولیدشده (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، V حجم ژلاتین تولیدشده (میلی‌لیتر) و M وزن نمونه پوست اولیه (میلی‌گرم) می‌باشد.

## تعیین استحکام ژل

طبق استاندارد BSI 757 (British Standards Institution 1975, [BSI]), محلولی با غلظت ۶/۶۷ درصد را آماده و سپس در بن‌ماری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای حدود ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا کاملاً ژلاتین حل شود. سپس آن را تا دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سرد کرده و به مدت ۱۶ ساعت در این دما نگاه‌داشته شد. پس از سپری‌شدن مدت زمان رسیدگی، استحکام ژل برحسب گرم با استفاده از بلوم‌سنج (فروربدن میله‌ای از جنس تفلون به قطر ۱/۲۷ سانتی‌متر تا عمق ۴ میلی‌متری درون ژل) اندازه‌گیری شد.

## ویسکوزیته

طبق استاندارد BSI 757 (BSI, 1975) محلولی با غلظت ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) از ژلاتین تهیه شد و ویسکوزیته آن با استفاده از دستگاه ویسکومتر (مدل رثولو Q30، ساخت اتریش) با سرعت ۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

### تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز با استفاده از روش استاندارد AOAC (۲۰۰۰) تعیین شد. در این روش از تری کلرواستیک اسید<sup>۱</sup> (TCA) و سانتیفریوژ (مدل 3E-1، ساخت آلمان) استفاده شد. درجه هیدرولیز نمونه‌ها باتوجه به رابطه (۳) محاسبه گردید:

$$\text{رابطه (۳)} \quad 100 \times \frac{\text{مقدار نمونه برداشت شده از سانتیفریوژ محلول شده}}{\text{مقدار نیتروژن کل در نمونه}} = (\text{درجه هیدرولیز})$$

### تعیین نقطه ذوب

نقطه ذوب نمونه ژلاتین به دست آمده طبق استاندارد BSI 757 (BSI, 1975) اندازه‌گیری شد. محلولی با غلظت ۶/۶۷ درصد تهیه و به لوله‌های آزمایش منتقل گردید. سپس آن را به مدت ۱۲-۱۸ ساعت در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده و بعد از این مدت، ۲ تا ۳ قطره از محلول ۰/۵ درصدی متیل رد-کلروفرم<sup>۲</sup> را به لوله‌های حاوی نمونه افزوده و در حمام آب با دمای اولیه ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن دما به صورت تدریجی افزایش یافت و دمایی که در آن، قطره کلروفرم آزادانه به کف لوله سقوط کرد، به منزله نقطه ذوب ژلاتین ثبت گردید.

### تعیین الگوی پروتئین به روش الکتروفورز

آزمون الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی‌آکریل‌امید<sup>۳</sup> (SDS-PAGE) پروتئین ژلاتین با روش Laemmli (۱۹۷۰) و استفاده از دستگاه آنالیز الکتروفورز (مدل PS2000-2، شرکت سیگما، ساخت آمریکا) انجام شد. ابتدا ژل را در قالب آماده نموده و سپس به منظور الکتروفورز نمونه‌های ژلاتین از ۱۵ درصد (وزنی/حجمی) ژل جداکننده در بین دو صفحه شیشه‌ای ریخته و با لایه نازکی از آب پوشانده شد. پس از انعقاد این لایه، آب بالایی آن را حذف کرده و روی آن، ۵ درصد (وزنی/حجمی) ژل متراکم‌کننده ریخته و بلافاصله، شانه برای ایجاد چاهک، در ژل قرار داده شد. پس از آماده‌شدن ژل، قالب شیشه‌ای را به تانک پر از بافر

الکتروفورز متصل کرده و بعد از عمل دناتوراسیون حرارتی نمونه‌ها، به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ انجام گرفت و سپس ۳۰ میکرولیتر از مخلوط نمونه ژلاتین و بافر و ۱۰ میکرولیتر از مارکر (استاندارد) به چاهک‌ها تزریق شد. الکتروفورز شروع به کار کرد و وقتی رنگ به انتهای شیشه رسید، جریان برق قطع شد و قالب شیشه‌ای از الکتروفورز جدا شد. سپس ژل را به مدت ۱۲ ساعت در محلول، غوطه‌ور نموده و پس از رنگ‌آمیزی، به مدت ۶ ساعت رنگ‌بری روی آن صورت گرفت تا باندهای پروتئینی به وضوح مشاهده شود.

### تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها براساس روش کاملاً تصادفی در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD<sup>۴</sup>) با ۶ تکرار در نقطه مرکزی برای سه متغیر و در سه سطح انجام شد. نتایج تحقیق با استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۷ به روش سطح پاسخ (RSM) آنالیز شده و هریک از متغیرهای پاسخ (بازده استخراج، استحکام ژل و درجه هیدرولیز) در قالب مدل رگرسیون درجه اول (رابطه ۴) به صورت تابعی از متغیرهای مستقل (غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج) ارائه شدند:

رابطه (۴)

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i$$

هریک از متغیرهای پاسخ (ویسکوزیته و نقطه ذوب) در قالب رگرسیون درجه دوم به صورت تابعی از متغیرهای مستقل فرایند آنزیمی (غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج) ارائه شدند (رابطه ۵):

رابطه (۵)

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_{ij}$$

در رابطه‌های (۴) و (۵)، Y نشان‌دهنده متغیر تابع یا پاسخ،  $\beta_0$ ،  $\beta_i$ ،  $\beta_{ii}$  و  $\beta_{ij}$  ضرایب مدل و  $X_i$  و  $X_{ij}$  متغیرهای مستقل می‌باشند.

### نتایج و بحث

#### تجزیه ترکیبات پوست

ترکیبات پوست گوسفند مورد استفاده در این تحقیق

<sup>1</sup> Trichloroacetic acid

<sup>2</sup> Methylene red chloroform

<sup>3</sup> Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

<sup>4</sup> Central composite design

غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بودند (جدول ۲ و ۳). ضرایب همبستگی بازده استخراج با متغیرهای فرایند استخراج ژلاتین استحصال‌شده از پوست گوسفند (جدول ۴) نشان می‌دهد که اثر زمان هیدرولیز بر بازده استخراج بیش از اثر غلظت آنزیم و دمای استخراج می‌باشد. همچنین اثر غلظت آنزیم بر بازده استخراج بیش از اثر دمای استخراج می‌باشد. این امر به دلیل تأثیر زمان کافی برای بی‌ثبات کردن پیوندهای هیدروژن در مولکول کلاژن می‌باشد که در نتیجه کلاژن بیشتری هیدرولیز و به ژلاتین تبدیل می‌شود (Mad-Ali, Benjakul, Prodpran, & Maqsood, 2016c).

از نظر میزان پروتئین  $23/54 \pm 1/43$ ، چربی  $18/90 \pm 0/27$ ، خاکستر  $27/91 \pm 0/35$  و رطوبت  $28/93 \pm 0/10$  تعیین شد. این ترکیبات نشان‌دهنده خصوصیات ماده اولیه می‌باشد.

### بازده استخراج

بازده استخراج ژلاتین تولیدشده دارای مقادیر  $9/79$  تا  $14/65$  درصد می‌باشد (جدول ۱). متغیرهای مستقل به ترتیب،  $X_1$ : غلظت آنزیم،  $X_2$ : درجه هیدرولیز و  $X_3$ : دمای استخراج و متغیرهای پاسخ به ترتیب  $Y_1$ : راندمان استخراج،  $Y_2$ : استحکام ژل،  $Y_3$ : ویسکوزیته،  $Y_4$ : درجه هیدرولیز و  $Y_5$ : نقطه ذوب می‌باشد. نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ در این پژوهش نشان داد که متغیرهای

جدول ۱- داده‌های آزمایشی استخراج آنزیمی و نتایج راندمان استخراج، استحکام ژل، ویسکوزیته، درجه هیدرولیز و نقطه ذوب ژلاتین

مشاهده‌ها	غلظت آنزیم (درصد)	درجه هیدرولیز (دقیقه)	دمای استخراج (سانتی‌گراد)	متغیرهای پاسخ			راندمان استخراج (درصد)	نقطه ذوب (سانتی‌گراد)
				استحکام ژل (گرم)	ویسکوزیته (میلی‌پاسکال بر ثانیه)	درجه هیدرولیز (درصد)		
۱	۰/۵	۲۴۰	۶۰	۱۷۰	۳/۲	۲۲	۱۲/۶	۲۴
۲	۰/۵	۶۰	۸۰	۱۸۳	۳/۶	۱۶	۱۰/۱	۲۷
۳	۰/۵	۶۰	۶۰	۱۸۵	۳/۷	۱۸	۹/۷۹	۲۴
۴	۰/۵	۲۴۰	۸۰	۱۶۵	۳	۲۱	۱۲/۷	۲۵
۵	۰/۵	۱۵۰	۷۰	۱۷۵	۲/۹	۲۷	۱۱	۲۶
۶	۱/۵	۱۵۰	۷۰	۱۳۷	۱/۷	۲۹	۱۱/۷	۲۷
۷	۱/۵	۲۴۰	۷۰	۱۳۱	۱/۵	۳۰	۱۳/۹۶	۲۳
۸	۱/۵	۶۰	۷۰	۱۴۰	۱/۹	۲۳	۱۰/۴۶	۲۵
۹	۱/۵	۱۵۰	۷۰	۱۳۵	۱/۷	۲۶	۱۱/۱۳	۲۲
۱۰	۱/۵	۱۵۰	۷۰	۱۳۷	۱/۹	۲۵	۱۱	۲۶
۱۱	۱/۵	۱۵۰	۷۰	۱۳۵	۱/۶	۲۹	۱۱/۹	۲۷
۱۲	۱/۵	۱۵۰	۶۰	۱۴۰	۱/۷	۳۱	۱۰/۹۲	۲۴
۱۳	۱/۵	۱۵۰	۸۰	۱۳۱	۱/۶	۲۴	۱۳/۵۳	۲۳
۱۴	۱/۵	۱۵۰	۷۰	۱۳۶	۱/۹	۲۹	۱۲/۲۷	۲۵
۱۵	۱/۵	۱۵۰	۷۰	۱۳۴	۱/۷	۳۰	۱۲/۳۵	۲۲
۱۶	۲/۵	۲۴۰	۸۰	۸۷	۱	۳۷	۱۴/۳	۱۵
۱۷	۲/۵	۶۰	۶۰	۹۷	۱/۴	۳۱	۱۲/۹	۱۹
۱۸	۲/۵	۲۴۰	۶۰	۸۷	۰/۹	۳۵	۱۴/۶۵	۱۶
۱۹	۲/۵	۱۵۰	۷۰	۹۵	۱/۲	۳۳	۱۲/۰۵	۱۷
۲۰	۲/۵	۶۰	۸۰	۱۰۷	۱/۶	۲۷	۱۲/۷	۲۰

جدول ۲- ضرایب برآورد شده مدل های رگرسیون راندمان استخراج، استحکام ژل، ویسکوزیته، درجه هیدرولیز و نقطه ذوب در استخراج آنزیمی ژلاتین

ضریب	درجه آزادی	بازده استخراج (درصد)	استحکام ژل (گرم)	ویسکوزیته (میلی پاسکال بر ثانیه)	درجه هیدرولیز (درصد)	نقطه ذوب (سانتی گراد)
X <sub>1</sub>	۱	۱/۰۴**	-۴۰/۵۰**	-۱/۰۳**	۵/۹۰**	-۴/۲۰**
X <sub>2</sub>	۱	۱/۲۳**	-۷/۲۰**	-۰/۲۶**	۳**	-۱/۵۰*
X <sub>3</sub>	۱	۰/۲۵**	-۰/۶۰ <sup>ns</sup>	-۱×۱۰ <sup>-۰/۰۰۲ ns</sup>	-۱/۲۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۱ <sup>ns</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	۱	-	-	۰/۰۰۰۱ <sup>ns</sup>	-	-۰/۳۸ <sup>ns</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	۱	-	-	۰/۰۸ <sup>ns</sup>	-	-۰/۱۳ <sup>ns</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	۱	-	-	۰/۰۳ <sup>ns</sup>	-	-۰/۱۳ <sup>ns</sup>
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	۱	-	-	۰/۴۵**	-	-۲/۵۰*
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	۱	-	-	۰/۱۰ <sup>ns</sup>	-	۰/۰۰۰۱ <sup>ns</sup>
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	۱	-	-	۰/۰۵ <sup>ns</sup>	-	-۰/۵۰ <sup>ns</sup>

(NS) غیرمعنی دار، (\*) معنی دار در سطح آماری ۵ درصد و (\*\*\*) معنی دار در سطح آماری ۱ درصد

جدول ۳- آنالیز واریانس رگرسیون راندمان استخراج، استحکام ژل، ویسکوزیته، درجه هیدرولیز و نقطه ذوب در استخراج آنزیمی ژلاتین

منابع تنوع	درجه آزادی	بازده استخراج (درصد)	درجه آزادی	استحکام ژل (گرم)	درجه آزادی	ویسکوزیته (میلی پاسکال بر ثانیه)	درجه آزادی	درجه هیدرولیز (درصد)	درجه آزادی	نقطه ذوب (سانتی گراد)	مجموع مربعات
خطی	۳	۲۶/۴۸**	۳	۱۶۹۲۴/۵۰**	۳	۱۱/۲۹**	۳	۴۵۲/۵۰**	۳	۱۹۸/۹۰**	
درجه دوم	۳	۲/۶۴ <sup>ns</sup>	۳	۴/۳۴ <sup>ns</sup>	۳	۱/۴۵**	۳	۳۲/۷۰ <sup>ns</sup>	۳	۴۰/۰۰*	
حاصل ضرب ها	۳	۰/۶۶**	۳	۵۸/۳۸ <sup>ns</sup>	۳	۰/۰۵ <sup>ns</sup>	۳	۹/۳۸ <sup>ns</sup>	۳	۱/۳۸ <sup>ns</sup>	
مدل	۳	۲۶/۴۸**	۳	۱۶۹۲۴/۵۰**	۹	۱۲/۷۹**	۳	۴۵۲/۵۰**	۹	۲۴۰/۲۸**	

(NS) غیرمعنی دار، (\*) معنی دار در سطح آماری ۵ درصد و (\*\*\*) معنی دار در سطح آماری ۱ درصد

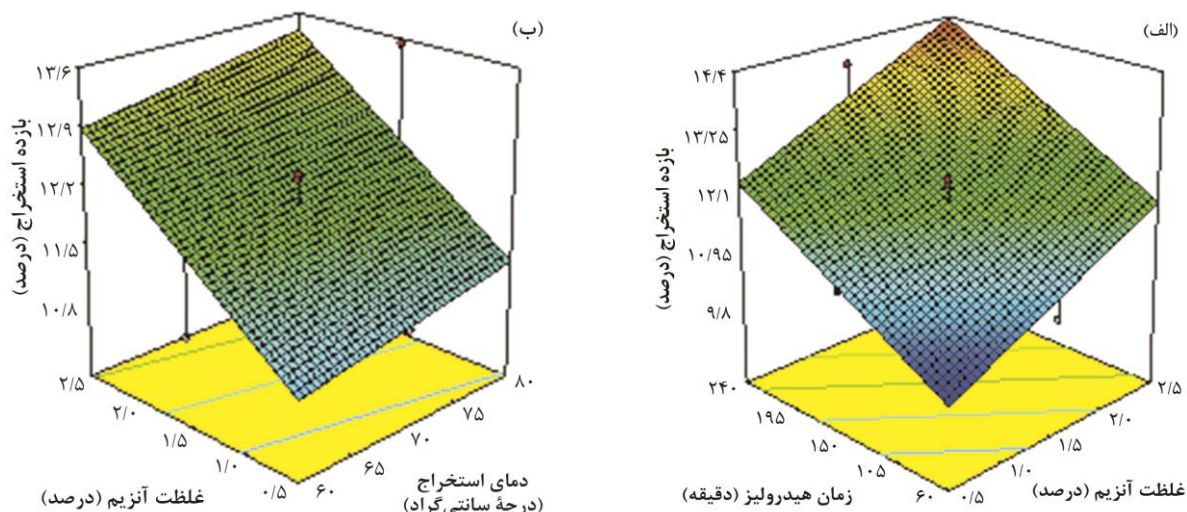
جدول ۴- ضرایب همبستگی میان متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی و متغیرهای تابع

متغیر	بازده استخراج (درصد)	استحکام ژل (گرم)	ویسکوزیته (میلی پاسکال بر ثانیه)	درجه هیدرولیز (درصد)	نقطه ذوب (سانتی گراد)	ضریب همبستگی
غلظت آنزیم	۰/۵۵	-۰/۹۸	-۰/۹۰	۰/۷۹	-۰/۸۱	
زمان هیدرولیز	۰/۶۵	-۰/۱۷	-۰/۲۳	۰/۴۰	-۰/۲۹	
دمای استخراج	۰/۱۳	-۰/۰۱	-۰/۰۱	-۰/۱۶	۰/۰۰	

افزایش می یابد (شکل ۱-ب). با افزایش میزان غلظت آنزیم میزان کلاژن های محلول بیشتر می گردد، بدین ترتیب کلاژن بیشتر و سریع تر هیدرولیز می شود. در نتیجه افزایش هیدرولیز، زنجیره های پروتئینی بیشتری در هلیکس سه تایی کلاژن دچار شکستگی شده و در نتیجه میزان کلاژن تولیدی بیشتر می شود (Mulyani et al., 2017).

روند تغییرات مقدار بازده استخراج در ژلاتین استحصال شده از پوست گوسفند در شکل (۱) نشان داده شده است. شکل (۱-الف) نشان می دهد که در یک دمای استخراج ثابت با افزایش غلظت آنزیم از ۰/۵ به ۲/۵ درصد و زمان هیدرولیز از ۶۰ به ۲۴۰ دقیقه، بازده استخراج ژلاتین افزایش می یابد و همچنین در یک زمان هیدرولیز ثابت افزایش غلظت آنزیم و دمای استخراج، بازده استخراج





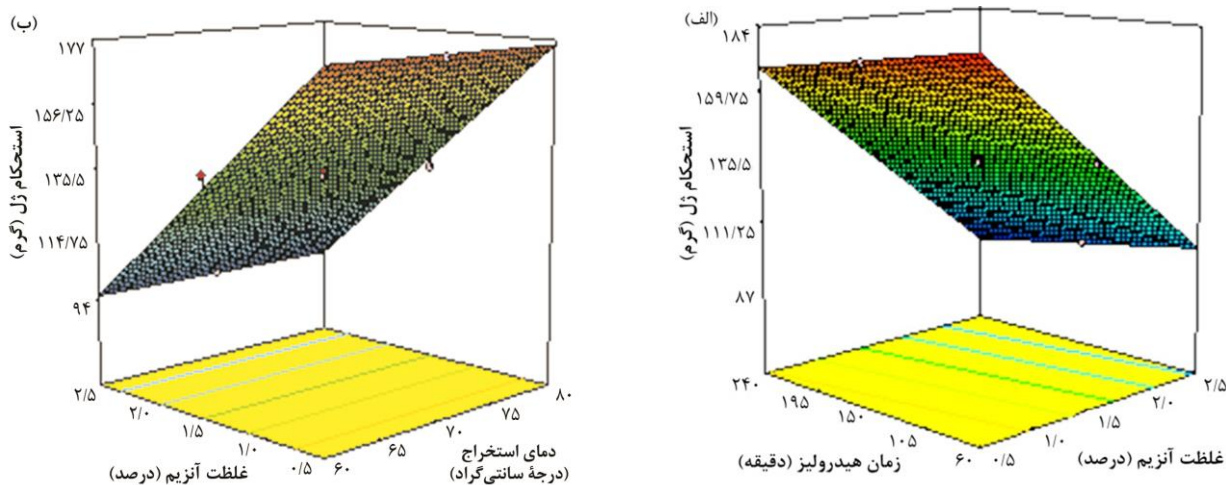
شکل ۱- تأثیر هم‌زمان متغیرهای غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج بر بازده استخراج ژلاتین

استحکام ژل (بلوم)

بلوم<sup>۱</sup> در واقع میزان سختی و ثبات، استحکام و تراکم‌پذیری ژل در دمای موردنظر است؛ یکی از ویژگی‌های کاربردی مهم ژلاتین که با اعمال بار (گرم) برای فشرده‌سازی ژل در شرایط عادی، آن را اندازه می‌گیرند ( Ahmed, Ptaszek, & Basu, 2016). نتایج آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند روی استحکام ژل نشان داد که فقط اثرات خطی غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز مدل تأثیر معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) داشتند (جدول ۲). ضرایب همبستگی میان متغیرهای فرایند و متغیرهای تابع نشان می‌دهد که غلظت آنزیم، تأثیر بیشتری روی کاهش میزان استحکام ژل نسبت به زمان هیدرولیز و دمای استخراج دارد. همچنین اثر دمای استخراج روی استحکام ژل کمتر از زمان هیدرولیز می‌باشد

(جدول ۴).

روند تغییرات استحکام ژل در استخراج ژلاتین استحصال‌شده از پوست گوسفند با متغیرهای غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج در شکل (۲) نشان داده شده است. در شکل (۲-ب) عدم تأثیر دمای استخراج روی استحکام ژل مشاهده می‌شود. همچنین نشان می‌دهند که با افزایش غلظت آنزیم، مقدار استحکام ژل کاهش می‌یابد. تأثیر غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز روی کاهش استحکام ژل به دلیل افزایش هیدرولیز و تولید زنجیره‌های کوتاه پپتیدی می‌باشد که در نهایت، کاهش در وزن مولکولی ژلاتین تولیدی سبب کاهش در قدرت تشکیل ژل می‌شود (Lassoued et al., 2014).



شکل ۲- تأثیر هم‌زمان متغیرهای غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج بر استحکام ژل ژلاتین

<sup>1</sup> Bloom

**ویسکوزیته**

توزیع وزن مولکولی، pH، غلظت، شرایط پیش‌عملیات، اندازه و توزیع مولکولی و پراکندگی بر ویسکوزیته مؤثرند (Mulyani *et al.*, 2017; Sanaei, Mahmoodani, See, Yusop, & Babji, 2013; ShahiriTabarestani *et al.*, 2017; Talapphet *et al.*, 2010). نتایج نشان داد که، غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز دو فاکتور مهم تأثیرگذار بر ویسکوزیته ژلاتین استحصال‌شده از پوست گوسفند بودند ( $P < 0.01$ ). در مقابل متغیر دمای استخراج تأثیر معنی‌داری بر ویسکوزیته نداشت (جدول ۲). ضرایب همبستگی متغیرهای فرایند با ویسکوزیته (جدول ۴) نشان می‌دهد که اثر غلظت آنزیم روی مقدار ویسکوزیته ژلاتین استحصال‌شده از پوست گوسفند بیش از اثر

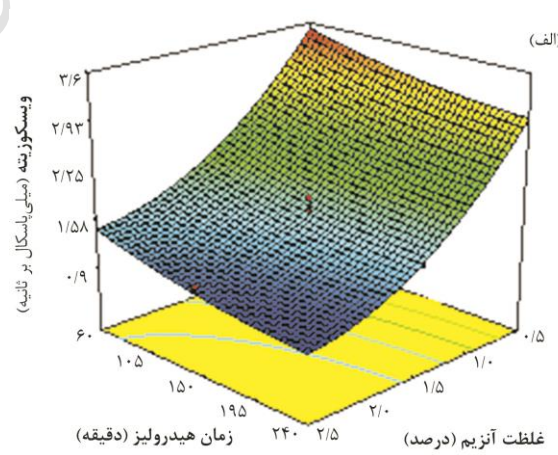
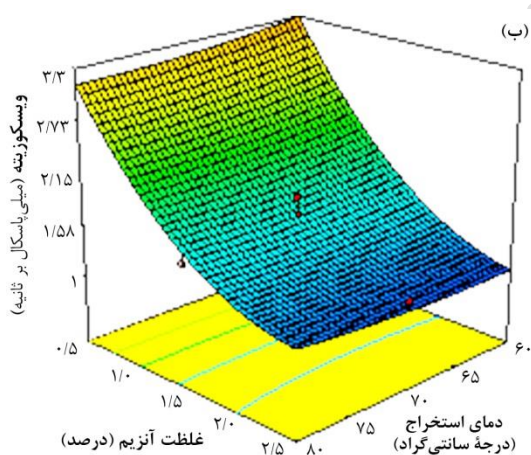
زمان هیدرولیز و دمای استخراج می‌باشد.

همان‌گونه که در شکل (۳-الف) نشان می‌دهد در دمای استخراج ثابت، با افزایش غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز مقدار ترکیبات هیدرولیز‌شده افزایش و در نتیجه مقدار ویسکوزیته کاهش می‌یابد. این کاهش ممکن است در نتیجه مدت زمان هیدرولیز، زنجیره‌های پپتیدی با وزن مولکولی پایین ایجاد گردد که در نهایت ژلاتین با ویسکوزیته پایین تولید می‌شود (Mohammad, Kumar, & Basha, 2015; Rafieian, Keramat, & Shahedi, 2015). همچنین شکل (۳-ب) نشان می‌دهد که در غلظت‌های بالای آنزیم، دمای استخراج روی ویسکوزیته تأثیر معنی‌داری نداشت. فاکتور عدم برازش برای صفت ویسکوزیته در سطح ۹۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۵).

**جدول ۵- شاخص‌های نیکویی برازش شده بازده استخراج، استحکام ژل، ویسکوزیته، درجه هیدرولیز و نقطه ذوب**

متغیر	بازده استخراج (درصد)	استحکام ژل (گرم)	ویسکوزیته (میلی‌پاسکال بر ثانیه)	درجه هیدرولیز (درصد)	نقطه ذوب (سانتی‌گراد)
ضریب تعیین تعدیل‌شده	۰/۷۰	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۸۱	۰/۸۸
مجموع مربعات خطای پیشگویی	۱۴/۳۸	۲۶۷/۹۰	۱/۱۲	۱۶۶/۴۵	۸۱/۸۳
فقدان برازش	۲/۱۲ <sup>ns</sup>	۳/۷۷ <sup>ns</sup>	۲/۱۸ <sup>ns</sup>	۱/۸۶ <sup>ns</sup>	۰/۱۸ <sup>ns</sup>
ضریب تغییرات	۶/۲۲	۲/۲۰	۷/۷۹	۹/۳۰	۷/۷۴

(ns) غیرمعنی‌دار



**شکل ۳- تأثیر هم‌زمان متغیرهای غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج بر ویسکوزیته ژلاتین**

متغیرهای فرایند و متغیر وابسته (جدول ۴) نشان می‌دهد که اثر متغیر غلظت آنزیم بر درجه هیدرولیز بیش از دو متغیر دیگر می‌باشد. تأثیر هم‌زمان غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج روی درجه هیدرولیز ژلاتین استحصال‌شده از پوست گوسفند در شکل (۴) نشان داده شده است.

شکل (۴) به‌خوبی نشان می‌دهد که زمان هیدرولیز و

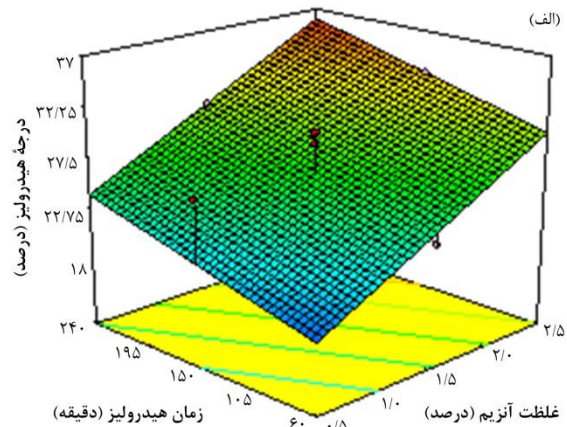
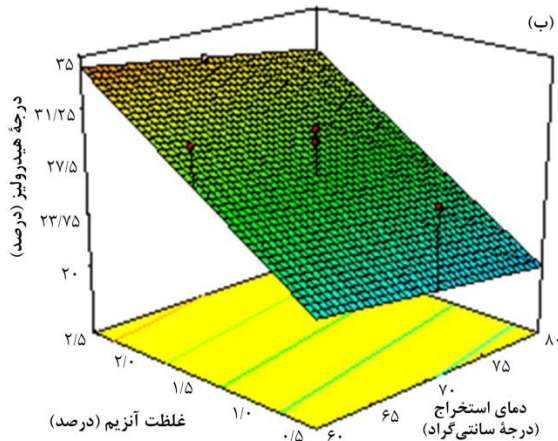
**درجه هیدرولیز (DH)**

درجه هیدرولیز به‌منزله پارامتر نظارت بر عملکرد پروتئولیز به‌کار می‌رود و بهترین آزمون برای مقایسه بین هیدرولیز پروتئین‌های مختلف است. آنالیز واریانس، معنی‌دار بودن اثر غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز ( $P < 0.01$ ) بر درجه هیدرولیز ژلاتین استحصال‌شده از پوست گوسفند را نشان می‌دهد (جدول ۲). ضرایب همبستگی پیرسون میان



غلظت آنزیم تأثیر زیادی روی درجه هیدرولیز محلول ژلاتین دارد. واضح است که با افزایش غلظت آنزیم، باندهای پپتیدی در سوبسترا بیشتر شکسته می‌شوند و در نتیجه درجه هیدرولیز نهایی را افزایش می‌دهند (Giménez, Alemán, Montero, & Gómez-Guillén, 2009; See et al., 2011). البته انتخاب مقدار غلظت آنزیم باید باتوجه به کل زنجیره‌های پپتیدی در سوبسترا و درجه شکست مناسب پروتئین انتخاب شود تا هزینه‌های مصرفی را کاهش دهد (Parmentier, 2004).

متغیر غلظت آنزیم روی نقطه ذوب ژلاتین حاصل شده بیش از زمان هیدرولیز است. تأثیر هم‌زمان غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج روی نقطه ذوب ژلاتین نشان می‌دهد که دمای استخراج تأثیر زیادی روی میزان نقطه ذوب محلول ژلاتین ندارد.

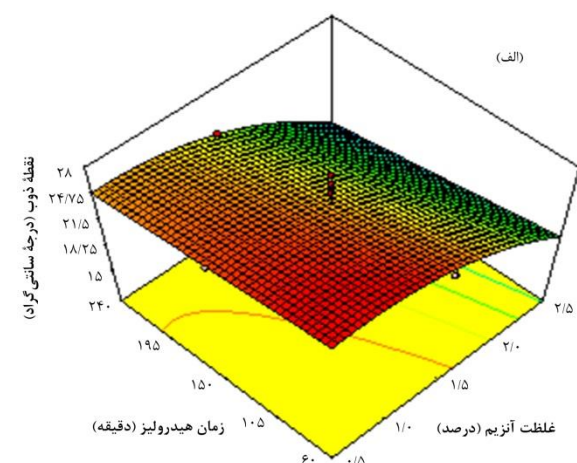
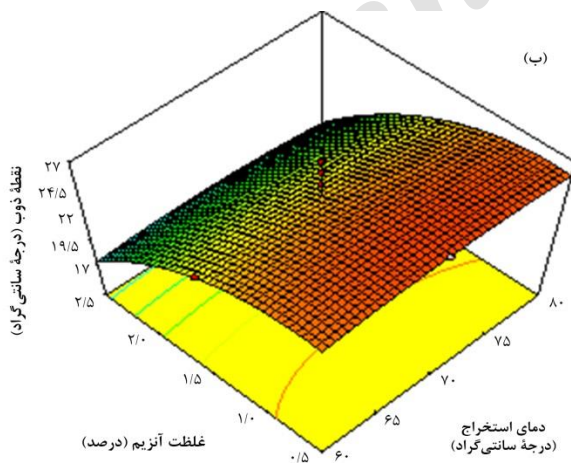


شکل ۴- تأثیر هم‌زمان متغیرهای غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج بر درجه هیدرولیز ژلاتین

همان‌طور که نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ (جدول ۳) نشان می‌دهد اثر غلظت آنزیم تأثیر ( $P < 0.01$ ) معنی‌داری بر نقطه ذوب ژلاتین حاصل از پوست گوسفند داشت. نقطه ذوب ژلاتین تولیدشده دارای طیف دمایی ۱۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین ضرایب همبستگی میان متغیرهای فرایند (جدول ۴) نشان می‌دهد که اثر

#### نقطه ذوب

تأثیر هم‌زمان متغیرهای غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج بر نقطه ذوب ژلاتین نشان می‌دهد که دمای استخراج تأثیر زیادی روی میزان نقطه ذوب محلول ژلاتین ندارد.



شکل ۵- تأثیر هم‌زمان متغیرهای غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز و دمای استخراج بر نقطه ذوب ژلاتین

حاوی ترکیبات اصلی زنجیره  $\beta$  و باندهای پروتئینی زنجیره  $\alpha$  است. بیشترین وزن مولکولی نمونه‌های ژلاتین تولیدشده در غلظت آنزیم پایین، بدون در نظر گرفتن زمان هیدرولیز

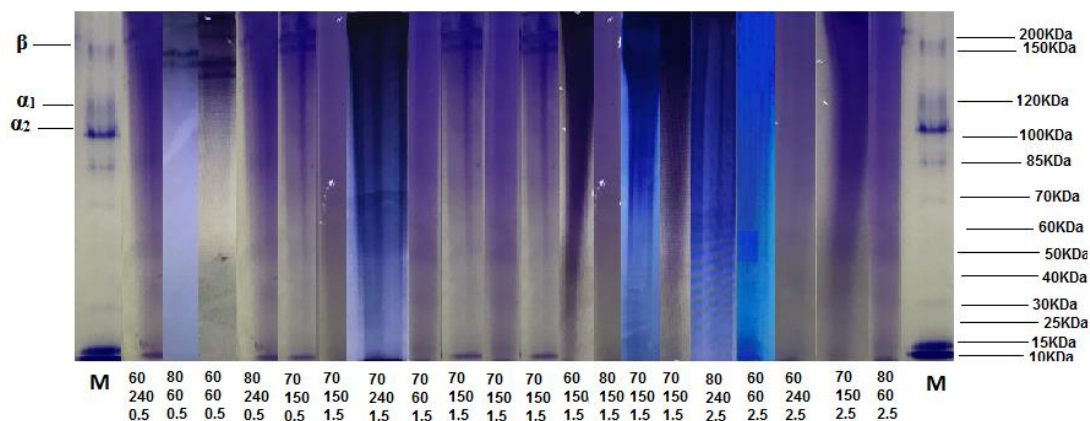
#### تعیین الگوی پروتئین به روش الکتروفورز

پروپایل‌های SDS-PAGE (شکل ۶) نشان می‌دهد که بعضی از نمونه‌های ژلاتین به‌دست‌آمده از پوست گوسفند

مجموع، با افزایش زمان، امکان تخریب ترکیبات زنجیره  $\alpha$  و  $\beta$  و حتی از بین رفتن کامل آنها بیشتر می‌شود.

مشخص شد که دمای استخراج در وزن مولکولی تأثیر چشمگیری نداشت (Du, Khiari, Pietrasik, & Betti, 2013; Mad-Ali et al., 2016a; Souissi, Bougatif, Triki-Ellouz, & Nasri, 2007). بنابراین غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز بر ترکیبات ژلاتین تولیدشده تأثیر دارند. از پروتئین نشانگر با وزن مولکولی مشخص به‌منزله استاندارد وزن مولکولی استفاده شد.

مشاهده شد. البته وجود برخی از مولکول‌های بزرگ ممکن است نتیجه تولید پروتئین‌های بزرگ موجود در مواد خام باشد که بر اثر هیدرولیز ناقص به‌وجود آمده‌اند. به‌طور کلی، وزن مولکولی ژلاتین استخراج‌شده متأثر از فرایند هیدرولیز است که به تقسیم‌شدن باندهای پپتیدی و نیز پیوند عرضی درون‌مولکولی بین زنجیره‌های پپتیدی کمک می‌کند (Nalinanon, Benjakul, Visessanguan, & Kishimura, 2008; Xu et al., 2017). با بالا رفتن زمان هیدرولیز (مثلاً از ۶۰ به ۲۴۰ دقیقه)، فرایند شکست در باندها بیشتر اتفاق می‌افتد و ژلاتین با وزن مولکولی پایین حاصل می‌شود. در



شکل ۶ - پروفایل‌های SDS-PAGE ژلاتین استحصال‌شده از ضایعات پوست گوسفند با استفاده از غلظت‌های مختلف آنزیم در دماهای متفاوت استخراج برای زمان‌های هیدرولیز مختلف؛ (M) نشانگر وزن مولکولی است و اعداد در هر ستون از بالا به پایین به‌ترتیب نشان‌دهنده دمای استخراج (درجه سانتی‌گراد)، زمان هیدرولیز (دقیقه) و غلظت آنزیم (درصد) می‌باشند.

و آنالیزهای انجام‌شده، دمای استخراج ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۰/۵ درصد غلظت آنزیم و ۱۶۶ دقیقه زمان هیدرولیز به‌عنوان نقطه بهینه اعلام شد که در آن، روند استخراج ژلاتین از پوست گوسفند در شرایط ایده‌آل بود و تقریباً تمام عوامل موردبررسی، در شرایط مطلوب بودند.

### تشکر و قدردانی

از همکاری آزمایشگاه‌های سورن‌تک‌توس، سرم‌سازی رازی و کارشناسان این واحدهای آزمایشگاهی و تمام عزیزانی که با همکاری‌های صمیمانه خود، انجام این پژوهش را ممکن و به ما یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

### نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که می‌توان با روش بهینه‌سازی سطح پاسخ، فرایند استخراج آنزیمی از ضایعات پوست گوسفند را مدل‌سازی کرد و باتوجه‌به مصرف گسترده ژلاتین در صنایع غذایی، که هر سال سبب افزایش واردات این محصول از سایر کشورها و خروج مقادیر زیادی ارز از کشور می‌شود، پیشنهاد می‌شود ضایعات پوست گوسفند در صنایع دباغی به‌منزله منبع خوبی برای تولید ژلاتین در مقیاس نیمه‌صنعتی ارزیابی شود. در این پژوهش، استفاده از آنزیم و پیش‌عملیات در فرایند استخراج، بر خصوصیات و ویژگی‌های ژلاتین حاصل‌شده مؤثر بودند. باتوجه‌به آزمون‌ها

### منابع

- Ahmed, J., Ptaszek, P., & Basu, S. (2016). *Advances in food rheology and its applications*: Woodhead Publishing.
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. 17<sup>th</sup> ed. In *Association of official analytical chemists*. Gaithersburg, Maryland, USA.
- British Standards Institution. (1975). *Methods for Sampling and Testing Gelatin (Physical and Chemical Methods)* (Vol. 757): BSI.

- Du, L., Khiari, Z., Pietrasik, Z., & Betti, M. (2013). Physicochemical and functional properties of gelatins extracted from turkey and chicken heads. *Poultry Science*, 92(9), 2463-2474. doi:<https://doi.org/10.3382/ps.2013-03161>
- Gbogouri, G., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69(8), C615-C622. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x>
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.050>
- Hosseiniparvar, S. H., Keramat, J., Kadivar, M., Khanipour, E., & Milani, E. (2006). Optimization of Enzymic Extraction of Edible Gelatin from Cattle Bones Using Response Surface Methodology (RSM). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 2(1), 1-14. (in Persian)
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (1994). *Specification for gelatin, "Food grad"*. (ISIRI Standard No. 3474). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardFiles/3474.htm>. (in Persian)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685. doi:<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.029>
- Mad-Ali, S., Benjakul, S., Prodpran, T., & Maqsood, S. (2016a). Characteristics and Gel Properties of Gelatin from Goat Skin as Influenced by Alkaline-pretreatment Conditions. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(6), 845-854. doi:<https://doi.org/10.5713/ajas.15.0784>
- Mad-Ali, S., Benjakul, S., Prodpran, T., & Maqsood, S. (2016b). Interfacial properties of gelatin from goat skin as influenced by drying methods. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 102-107. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.048>
- Mad-Ali, S., Benjakul, S., Prodpran, T., & Maqsood, S. (2016c). Characteristics and gel properties of gelatin from goat skin as affected by pretreatments using sodium sulfate and hydrogen peroxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 2193-2203. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.7336>
- Mad-Ali, S., Benjakul, S., Prodpran, T., & Maqsood, S. (2017). Characteristics and Gel Properties of Gelatin from Goat Skin as Affected by Extraction Conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12949. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.12949>
- Mohammad, A. W., Kumar, A. G., & Basha, R. K. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis Spp.*) scale gelatine. *International Aquatic Research*, 7(1), 27-39. doi:<https://doi.org/10.1007/s40071-014-0090-6>
- Mulyani, S., Setyabudi, F., Pranoto, Y., & Santoso, U. (2017). The effect of pretreatment using hydrochloric acid on the characteristics of buffalo hide gelatin. *Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 42(1), 14-22. doi:<https://doi.org/10.14710/jitaa.42.1.14-22>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.012>
- Rafieian, F., Keramat, J., & Shahedi, M. (2015). Physicochemical properties of gelatin extracted from chicken deboner residue. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1370-1375. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.050>
- Salwaneh, S., Mustapha, W. A. W., Mamot, S., Maskat, M. Y., & Ibrahim, S. (2013). Effects of enzyme concentration, temperature, pH and time on the degree of hydrolysis of protein extract from viscera of tuna (*Euthynnus affinis*) by using alcalase. *Sains Malaysiana*, 42(3), 279-287.
- Sanaei, A., Mahmoodani, F., See, S., Yusop, S. M., & Babji, A. S. (2013). Optimization of gelatin extraction and physico-chemical properties of catfish (*Clarias gariepinus*) bone gelatin. *International Food Research Journal*, 20(1), 423.
- See, S., Hoo, L., & Babji, A. S. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *International Food Research Journal*, 18(4).
- ShahiriTabarestani, H., Maghsoudlou, Y., Motamedzadegan, A., & Sadeghi Mahoonak, A. (2010). Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Bioresource Technology*, 101(15), 6207-6214. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.071>
- Souissi, N., Bougateg, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 187-194.
- Talapphet, N., Prommajak, T., & Raviyan, P. (2017). Process Optimization and Properties of Crude Gelatin Extracted from Tannery Bovine Hide. *Food and Appling Bioscience Journal*, 5(3), 132-148. doi:<https://doi.org/10.14456/fabj.2017.11>
- Tehran Chamber of Commerce, Industries, Mines and Agriculture. (2017). Retrieved from <http://tccim.ir/news/FullStory.aspx?nid=49230> (in Persian)
- Xu, M., Wei, L., Xiao, Y., Bi, H., Yang, H., & Du, Y. (2017). Physicochemical and functional properties of gelatin extracted from Yak skin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 1246-1253. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.020>

## Optimization of Gelatin Extraction Process, from Sheep Skin Waste Using Alcalase Enzyme by Response Surface Method

Mahdi Zarei<sup>1</sup>, Mostafa Mazaheri Tehrani<sup>2\*</sup>, Hasan Rashidi<sup>3</sup>, Mohsen Fathi Najafi<sup>4</sup>

1-Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

\* Corresponding author (mmazaheri@um.ac.ir)

3-Assistant Professor, Department of Food Industries, Agricultural Research and Education Center, Khorasan Razavi, Agricultural Research and Training Organization, Mashhad, Iran

4-Assistant Professor of Razi Vaccine and Serum Research Center, Mashhad, Iran

### Abstract:

This study determined the optimal conditions for enzyme-assisted gelatin extraction from sheep skin waste using the effects of three variables: enzyme concentration (0.5-2.5%), hydrolysis time (60-240 min), and extraction temperature (60-80 °C). The impact of these three variables was studied on extraction, yield, gel strength, viscosity, degree of hydrolysis, melting point and SDS-PAGE, and the results were analyzed by using the central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM). Also the analysis of variance table showed that the lack of fit was not significant for all response surface models at 95%. The results showed that enzyme concentration 0.5%, hydrolysis time of 166 min, and extraction temperature 60 °C are the desirable condition for optimal extraction (11.03%) and optimal degree of hydrolysis (23.00%). In addition, the effects of these three variables on gel strength, viscosity and melting point were significant, and in optimal conditions, gel strength was measured as 175.33 g, viscosity as 3.26 Mpa/sec, and melting point as 25.39 °C.

**Keywords:** Enzymatic Extraction, Gelatin, Response Surface, Sheep Skin Waste