Archive of SID

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوازدهم، شماره 1، بهار 1396، صفحات 58-47

بهینه‌سازی استخراج و تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کلاژن حاصل از غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ

رضا محمدی[1]، معصومه تقی زاده[2]، فاطمه عسکری[2]، شیرین مرادی[3]، محمد امین محمدی فر[4]، روح الله فردوسی[5]، امیرمحمد مرتضویان[6]

1- استادیار گروه علوم صنایع غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

2- دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

3- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

4- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

5- استادیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

6- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیک: mortazvn@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: 94/12/17 تاریخ پذیرش: 95/4/4

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

چکیده

سابقه و هدف: کلاژن از جمله پروتئین‌هایی است که دارای کاربردهای مختلفی در صنایع دارویی، آرایشی، پزشکی و غذایی است که به طور معمول از منابع مختلفی مانند پوست گاو، خوک، مرغ و ماهی تهیه می‌شود. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی استخراج کلاژن از غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ و تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن است.

مواد و روش‌ها: بازده استخراج کلاژن در غلظت‌های مختلف هیدروکسید سدیم (0/2-1/2 نرمال)، در زمان‌های تیمار مختلف (6-36 ساعت)، غلظت‌های آنزیم پپسین (90-15U/mg) و زمان‌های هیدرولیز آنزیمی (6-60 ساعت) با روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد و همچنین ویژگی‌هایی مانند تعیین میزان حلالیت در pH و غلظت‌های مختلف نمک، تعیین وزن مولکولی و آنالیز اسیدهای آمینه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مهم‌ترین عوامل استخراج کلاژن با استفاده از روش سطح پاسخ بر طبق طرح مرکب مرکزی (CCD) بهینه‌سازی شدند. غلظت سود 0/76 نرمال، زمان تیمار قلیایی 18 ساعت، غلظت آنزیم 50U/mg، زمان هیدرولیز 43/42 ساعت، شرایط بهینه برای استخراج کلاژن محلول با استفاده از آنزیم پپسین (PSC) از غشاء پوسته تخم‌مرغ هستند که در این شرایط، بازدهی 30/049 درصد به دست آمد. انحلال‌پذیری کلاژن در pH=3 و غلظت NaCl کمتر از 2% به دست آمد. آنالیز اسیدهای آمینه نشان داد که گلایسین با 322 اسید آمینه در هزار به عنوان بیشترین اسید آمینه و میزان ایمینواسید (مجموع اسیدهای آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین) کلاژن 19/5درصد بود. الگوی پروتئینی نشان داد که به غیر از دو زنجیره α دارای دو جزء با وزن مولکولی بالا با پیوندهای عرضی زیاد هستند که شامل زنجیره‌های β و γ است.

نتیجه‌گیری: بازده استخراج کلاژن از پوسته تخم‌مرغ مطلوب است، که می‌توان از آن در تولید فیلم، ژلاتین و ترکیبات غذایی فراسودمند برای حفظ سلامت استفاده کرد.

واژگان کلیدی: استخراج، کلاژن، روش سطح پاسخ، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

• مقدمه

در سال‌های اخیر، افزایش جمعیت به خصوص در کشورهای در حال توسعه و افزایش سطح رفاه عمومی منجر به افزایش پسماندهای غذایی شده که از نظر کمی و کیفی مقدار آن قابل توجه هستند. مهم‌ترین آنها شامل سبوس، تفاله چغندر، آب پنیر، بقایای حاصل از میوه‌ها و سبزیجات، پوست حیوانات و پوسته تخم‌مرغ است که دارای کاربردهای متفاوتی در تغذیه دام و طیور، کشاورزی و صنایع غذایی هستند. بر اساس آمار و ارقام وزارت جهاد کشاورزی حدود یک میلیون تن تخم‌مرغ در ایران در سال 1393 تولید شده است که با توجه به اینکه 10% درصد تخم‌مرغ را پوسته تخم‌مرغ تشکیل می‌دهد، سالانه 100هزار تن پوسته تخم‌مرغ در کشور به عنوان ضایعات تولید می‌شود (1). مهم‌ترین کاربردهای آن

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

شامل حاصلخیزی مزارع، به عنوان مکمل در خوراک طیور، صنایع کاغذسازی و تثبیت‌سازی آنزیم‌ها است (2). پوسته تخم‌مرغ از دو لایه خارجی (پوسته آهکی) و داخلی (غشای داخلی سفید رنگ) تشکیل شده است که جداسازی آنها از یکدیگر امکان کاربردهای بیشتری از این ضایعات را فراهم می‌سازد. ترکیبات غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ شامل کندروتین سولفات، گلوکزآمین، پروتئین‌های سفیده، کلاژن و آنزیم لیزوزیم است که دارای کاربردهایی مانند دارویی، نانوتکنولوژی، ضدمیکروبی و غذایی هستند(4-2).

کلاژن پروتئینی است که بخشی از بافت پیوندی در ماهیچه و ارگان‌های پوست، استخوان، دندان و تاندون‌ها را تشکیل می‌دهد. در ساختار آن سه زنجیره پروتئینی، به‌صورت مارپیچ سه‌گانه وجود دارد که دارای توالی اسیدهای آمینه مخصوصی مانند گلایسین- پرولین- هیدروکسی پرولین- گلایسین می‌باشد و به صورت متوالی تکرار می‌شود. کلاژن دارای کاربردهای مختلفی از جمله در صنایع دارویی، آرایشی، پزشکی و غذایی است که مهم‌ترین کاربردهای آن در صنایع غذایی می‌توان به تولید ژلاتین و فیلم‌های خوراکی اشاره کرد(5, 6). بیش از 27 نوع کلاژن شناخته شده‌اند که تفاوت آنها در توالی اسیدهای آمینه، ساختار و عملکرد آنها است. مهم‌ترین و فراوان‌ترین نوع کلاژن، کلاژن نوع I است (4، 3). کلاژن به طور معمول از منابع مختلفی مانند پوست گاو، خوک، مرغ و ماهی تهیه می‌شود. به دلیل وجود مشکلاتی مانند بیماری جنون گاوی، بیماری‌های دست و پا، آنفلولانزای مرغی، حلال بودن یا نبودن، خلوص پایین کلاژن تهیه شده و حساسیت‌های پوستی در سال‌های اخیر توجه زیادی به منبع جدیدی به عنوان جانشینی برای این منابع شده است. یکی از این منابع جدید پوسته تخم‌مرغ است که فاقد مشکلات فوق است (7، 2). به طورکلی مراحل استخراج کلاژن شامل هضم قلیایی، استفاده از حلال جهت حذف چربی و هضم اسیدی است. در چند سال اخیر تحقیقات نشان داده است که با اضافه کردن آنزیم پپسین به مرحله اسیدی میزان بازدهی استخراج کلاژن افزایش پیدا کرده است(8). باتوجه به نوع منبع کلاژن تهیه شده و شرایط استخراج مانند زمان و غلظت واکنش دهنده‌ها میزان بازدهی کلاژن استخراج شده متفاوت است(5). جهت بهینه کردن شرایط استخراج کلاژن غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ می‌توان از روش سطح پاسخ استفاده کرد. این تکنیک آماری می‌تواند روابط بین پاسخ و متغیرها تعیین کرده و اثر متغیرها را چه به صورت تنها و چه به صورت ترکیب بر روی پاسخ‌ها مشخص کند(9). شناخت کافی از ویژگی‌های عملکردی کلاژن استخراج شده مانند میزان محلولیت در غلظت‌های مختلف نمک و pHهای مختلف، دناتوراسیون و اثر غلظت کلاژن، نمک و دما بر پارامترهای رئولوژیک پایا و نوسانی کلاژن را برای یک کاربرد خاص مناسب می‌سازد(10).

هدف از این پژوهش تعیین شرایط بهینه برای استخراج کلاژن از پوسته تخم‌مرغ، اندازه‌گیری پروفایل اسیدهای آمینه، تعیین وزن مولکولی و حلالیت نسبی در غلظت‌های مختلف نمک و pH می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل هیدروکسید سدیم(Merck آلمان)، اسید استیک (Merck آلمان)، آنزیم پپسین (Sigma-Aldrich آمریکا) غشای دیالیزی (Sigma-Aldrich آمریکا) Tris (Sigma-Aldrich چین) و کلرید سدیم (Merck آلمان) می‌باشد.

بهینه‌سازی استخراج کلاژن از پوسته تخم‌مرغ: بعد از تهیه پوسته تخم‌مرغ از قنادی‌های سطح شهر ابتدا با آب 50°C شستشو داده شد، به طوری‌که سفیده تخم‌مرغ و سایر ناخالصی‌های دیگر حذف شده سپس برای جداسازی پوسته آهکی از غشای داخلی اسید کلریدریک 0/1 نرمال به آب 60°C افزوده و به مدت 15 دقیقه نگهداری شد. 5g از غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ خشک شده در معرض غلظت‌های مختلف هیدروکسید سدیم (0/2-1/2 نرمال) به نسبت 10:1 در مدت زمان‌های مختلف (36-6ساعت) قرار گرفت و عمل شستن تا pH خنثی انجام گرفت. بعد از این مرحله، غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ جدا شده در اسید استیک 0/5 مولار قرار گرفت و سپس مقادیر متفاوتی از غلظت آنزیم پپسین (90-15U/mg) اضافه و در مدت زمان‌های متفاوتی واکنش آنزیمی انجام گرفت (60-6 ساعت). سپس با استفاده صافی قسمت جامد را از محلول جدا نموده و به قسمت محلول نمک 2M همراه با مقداری تنظیم کننده pH اضافه کرده (Tris) و به مدت 6 ساعت نگه داشته و عمل سانتریفیوژ (Sigma 3-K آلمان) با 30000g به مدت 20 دقیقه در دمای 4°C انجام گرفت. قسمت رسوب را برداشته و با حل کردن مجدد در اسید استیک 0/5 مولار عمل نمک‌زدایی به وسیله غشای دیالیزی (Cut off 10KDa) به مدت 24 ساعت انجام گرفت. دوباره عمل سانتریفیوژ با 20000g به مدت 10 دقیقه انجام شده سپس رسوب حاصله با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک نموده و پودر حاصل کلاژن استخراج شده با آنزیم پپسین (Pepsin Soluble Collagen) است. لازم به ذکر است در این مطالعه ابتدا با استفاده آزمایشات مقدماتی مقدار سطح متغیرهای مستقل تعیین شد. سپس، روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی اثر چهار فاکتور غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

سود، مدت زمان تیمار سود، غلظت آنزیم و مدت زمان هیدرولیز آنزیمی در پنج سطح استفاده شد.

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کلاژن استخراج شده

آزمون SDS-PAGE: SDS-PAGE بر اساس روش Muyonga و همکاران در سال2004 با اندکی تغییرات انجام شد (11). ابتدا کلاژن استخراج شده از پوسته‌ی تخم‌مرغ (PSC) را در 5 درصدسدیم دودسیل سولفات (SDS) حل نموده و سپس به مدت یک ساعت در حمام آب گرم قرار گرفت. با استفاده از سانتریفیوژ (آلمان sigma 3-k) در شرایط 10000g به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق ذرات حل نشده جداسازی شد. نمونه محلول به نسبت یک به یک با محلول بافر (Tris 0.5 M, pH=6.8, 4% SDS, 20%glycerol, 10% β-ME) مخلوط و به مدت دو دقیقه در آب جوش قرار گرفت. 15-20 میکرولیتر از نمونه، کلاژن نوع I و مارکرها به چاهک‌های ایجاد شده در ژل پلی آکریل آمید که از ژل پایین 7/5% و از ژل بالای 4% تشکیل شده تززیق شد و سپس الکتروفورز با ولتاژ 120 به مدت 4 ساعت انجام شد. بعد از الکتروفورز، ژل با کوماسی آبی به مدت 20 دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. سپس با محلول رنگ بر شامل متانول، استیک اسید گلاسیال و آب مقطر عمل رنگ‌بری انجام گرفت. مارکرهای با وزن مولکولی بالا جهت تخمین وزن مولکولی پروتئین‌ها استفاده شد که شامل میوزین (200KDa)، ماکروگلوبولین (170KDa)، بتاگالاکتوزیداز (116KDa)، ترانسفرین (76KDa) و گلوتامات دهیدروژناز (53KDa) است.

آنالیز اسیدهای آمینه کلاژن استخراج شده: حدود ده میلی‌گرم از نمونه لیوفلیز شده کلاژن در اسید کلریدریک 6 نرمال (HCl 6 N) در دمای 110°C به مدت 24 ساعت قرار گرفت و نمونه هیدرولیز شده به دستگاه پروفایل اسیدهای آمینه (Amino acid Analyzer انگلستان) و مقدار اسیدهای آمینه نمونه بر اساس استاندارد اسیدهای آمینه تزریق شده اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان محلولیت نسبی درpHهای مختلف: مقدار معینی از کلاژن استخراج شده را در 0/5 درصد اسید استیک حل و با استفاده از HCL و NaOH 6 نرمال pHهای مختلف 1-10 در محلول کلاژن تهیه و سپس در شرایط 20000g به مدت 30 دقیقه در دمای 4°Cمحلول را سانتریفیوژ و مقدار کلاژن رسوب شده در pHهای مختلف اندازه‌گیری شد و منحنی میزان محلولیت نسبی به pH با استفاده از نرم‌افزار اکسل (Version 2010) رسم شد. تعیین میزان محلولیت نسبی در غلظت‌های متفاوت نمک مقدار معینی از کلاژن استخراج شده را در 0/5 درصد اسید استیک حل نموده و غلظت‌های متفاوت نمک (0% ، 1%، 2%،3%، 4% ،5% و 6%) به آن اضافه شد. سپس بعد از 30 دقیقه عمل هم زدن، در شرایط 20000 g به مدت 30 دقیقه در دمای 4°Cمحلول را سانتریفیوژ و مقدار کلاژن رسوب شده اندازه‌گیری شد. منحنی میزان محلولیت نسبی به غلظت نمک اضافه شده با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم شد.

• یافته‌ها

بهینه‌سازی استخراج کلاژن از غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ: مهم‌ترین عوامل استخراج کلاژن با استفاده از روش RSM بر طبق طرح مرکب مرکزی (CCD) بهینه‌سازی شدند. دامنه و مقادیر نقطه مرکزی برای چهار متغیر مستقل بر اساس نتایج حاصل از آزمایش‌های اثرات منفرد هر یک متغیرها انتخاب شد. به طور کلی، برای بهینه‌سازی چهار متغیر فرآیند (غلظت سود = X_1، زمان تیمار قلیایی=X_2، غلظت آنزیم= X_3، زمان هیدرولیز آنزیمی =X_4) در طرح مرکب مرکزی (CCD) تعداد 30 آزمایش انجام گرفت که در جدول 1 نشان داده شده است. نتایج حاصل از جدول 1 نشان داد محدوده میزان بازدهی استخراج کلاژن از 14/8 تا 30/1درصد است. حداکثر بازدهی کلاژن (30/1 درصد) در شرایط غلظت سود 0/8 نرمال، زمان تیمار قلیایی 18 ساعت، غلظت آنزیم 75U/mg و زمان هیدرولیز 36 ساعت مشاهده شد.

جدول 1. نمایش سطوح کدبندی و واقعی متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آنها

متغیر	مقادیر				
	-2	-1	0	1	2
غلظت سود (نرمال)	0/4	0/6	0/8	1	1/2
مدت زمان تیمار سود (ساعت)	6	12	18	24	30
غلظت آنزیم (واحد بر میلی گرم)	15	30	45	60	75
مدت زمان هیدرولیز آنزیمی (ساعت)	12	24	36	48	60

با به کار بردن تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه بر روی داده‌های تجربی، پاسخ و متغیرهای آزمون بر طبق معادله چند جمله‌ای درجه دوم زیر با هم در ارتباط بودند.

$$Y= -51.85208+121.43750\ X_1 +1.76667X2 +0.43806X_3 + 0.33333X_4 - 0.85417X_1\ X_2+0.03750X_1\ X_3+ 0.09375X_1\ X_4- 5.5556X_2\ X_3 - 2.95139X_2X_4 - 1.38889X_3X_4 -73.593757X_1X_1- 0.02760X_2X_2- 3.19444X_3X_3- 3.25521X_4X_4$$

که در آن Y بازده کلاژن محلول استخراج شده توسط آنزیم و X_1،X_2،X_3وX_4 به ترتیب متغیرهای کد شده برای غلظت سود مصرفی، زمان تیمار قلیایی، غلظت آنزیم پپسین و زمان هیدرولیز آنزیمی هستند. نتایج آماری از بازده استخراج برای مدل پیش‌بینی کننده درجه دوم در جدول2 نشان داده شده است.

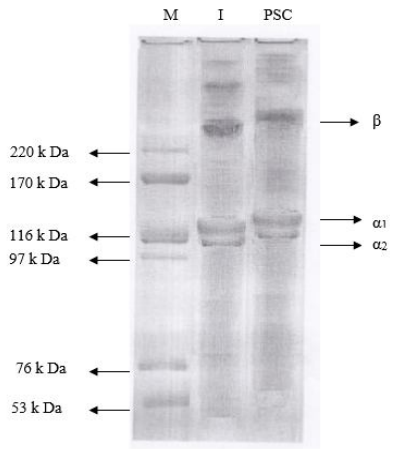
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2. نمایش طراحی آزمون‌ها بر اساس مدل طرح مرکب مرکزی برای میزان استخراج کلاژن محلول از غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ

شماره آزمون	متغییرهای مستقل				پاسخ
	غلظت سودمصرفی (N) X_1	زمان تیمار قلیایی (h) X2	غلظت آنزیم (U/mg) X3	زمان هیدرولیز آنزیمی(h) X4	میزان استخراج Y (%)
1	1-	1-	1-	1-	21/6
2	1-	1-	1-	1+	23/9
3	1-	1-	1+	1-	25/8
4	1-	1-	1+	1+	26/7
5	1-	1+	1-	1-	24/3
6	1-	1+	1-	1+	24/8
7	1-	1+	1+	1-	27/5
8	1-	1+	1+	1+	28/1
9	1+	1-	1-	1-	20/5
10	1+	1-	1-	1+	23/5
11	1+	1-	1+	1-	25/1
12	1+	1-	1+	1+	26/7
13	1+	1+	1-	1-	20/5
14	1+	1+	1-	1+	20/8
15	1+	1+	1+	1-	22/9
16	1+	1+	1+	1+	23/9
17	2-	0	0	0	20/3
18	2+	0	0	0	14/8
19	0	2-	0	0	26/1
20	0	2+	0	0	24/6
21	0	0	2-	0	22/8
22	0	0	2+	0	30/1
23	0	0	0	2-	26/3
24	0	0	0	2+	28/6
25	0	0	0	0	28/9
26	0	0	0	0	29/4
27	0	0	0	0	28/8
28	0	0	0	0	29/5
29	0	0	0	0	29/3
30	0	0	0	0	29/5

الگوی پروتئینی SDS-PAGE : الگوی پروتئینی SDS-PAGE کلاژن محلول استخراج شده توسط آنزیم پپسین، مارکرهای پروتئین و کلاژن پوست گاو به عنوان استاندارد (کلاژن نوع I) در شکل 1 نشان داده شده است. الگوی استخراجی در کلاژن استخراج شده شامل زنجیره‌های α_1 (97kDa) α_2 (کمی بیش از 116 kDa) که بر اساس پهنای باند به نسبت تقریبی دو به یک هستند (دو زنجیره α_1 و یک زنجیره α_2). همچنین نتایج حاصل از الگوی پروتئینی SDS-PAGE نشان داد که به غیر از دو زنجیره α دارای دو جزء با وزن مولکولی بالا هستند که شامل زنجیره‌های β (بیش از 220 kDa) و γ (بیش از 220 kDa) است.



شکل1. الگوی پروتئینی SDS- PAGEکلاژن حل شده با پپسین(PSC)، مارکرهای پروتئین (M) وکلاژن پوست گاو به عنوان استاندارد (I)

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

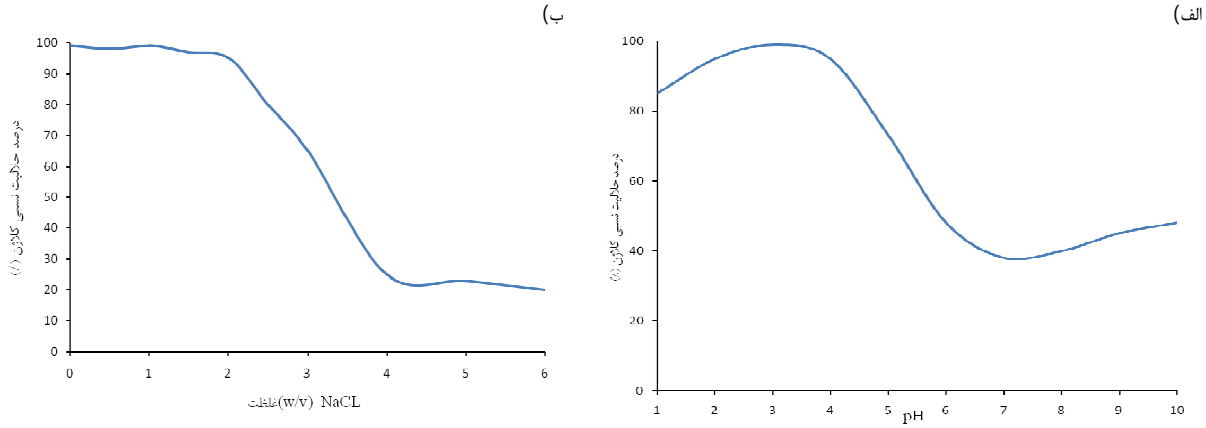
ترکیب اسیدهای آمینه کلاژن پوسته تخم‌مرغ: ترکیب اسیدهای آمینه کلاژن استخراج شده از پوسته تخم‌مرغ در جدول 3 نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که بیشترین مقدار اسید آمینه به ترتیب مربوط به گلایسین (318 در هزار اسیدآمینه)، پرولین (112 در هزار اسید آمینه)، آلانین (در هزار اسید آمینه 103) و هیدروکسی پرولین (83 در هزار اسیدآمینه) هستند. مقدار ایمینواسیدها (مجموع پرولین و هیدروکسی پرولین) در کلاژن استخراج شده195 در هزار اسیدآمینه است که حدود 19/5 درصد کل اسیدهای آمینه را تشکیل می‌دهد که بر اساس مطالعات گذشته این مقادیر در پوست گاو و ماهی به ترتیب 21/6 و 17/2 درصد است. مقدار اسیدهای آمینه سیستئین و تریپتوفان بسیار ناچیز هستند.

اثر pH و غلظت NaCl بر انحلال پذیری کلاژن : شکل 2-الف تأثیر pH را بر انحلال پذیری کلاژن محلول در پپسین از غشای پوسته تخم‌مرغ در استیک اسید 0/5 مولار را نشان می دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین انحلال پذیری PSC در pH=2 (P<0/05) مشخص شده است. انحلال پذیری PSC در استیک اسید 0/5مولار، در حضور صفر تا 2 درصد NaCl ثابت باقی می‌ماند(شکل ب). در غلظت بالاتر از 2% انحلال پذیری کلاژن به شدت کاهش می‌یابد (شکل 2-ب).

جدول3. ترکیب اسیدهای آمینه کلاژن محلول استخراج شده از پوسته تخم‌مرغ در مقایسه با مقادیر کلاژن استخراج شده از پوست گاو و ماهی

نوع اسید آمینه	مقادیر کلاژن محلول غشای پوسته تخم‌مرغ	مقادیر کلاژن محلول پوست گاو*	مقادیر کلاژن محلول پوست ماهی*
اسید آسپارتیک/ آسپارژین	55	45	50
اسید گلوتامیک/ گلوتامین	98	76	69
تروئنین	23	18/4	27
سرین	34	33/2	37
گلایسین	318	330	340
آلانین	103	119	133
والین	20	21/5	23
متیونین	9	6/1	11
سیستئین	4	00	2
ایزولوسین	13	11/4	12
لوسین	24	23	20
تیروزین	6	3/7	4
فنیل آلانین	8	3/3	14
هیستدین	7	5/3	6
آرژنین	62	51	50
لیزین	21	26/5	28
هیدروکسی پرولین	83	95	68
پرولین	112	121	106
کل اسیدهای آمینه	1000	1000	1000
ایمینو اسیدها	195	216	172

*نتایج به دست آمده توسط woo و همکاران در سال 2008 ** نتایج به دست آمده توسط Huang و همکاران در سال 2011



شکل 2 . بررسی تأثیر pH و غلظت NaCl بر انحلال پذیری کلاژن

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج آنالیز واریانس ضرایب رگرسیون مدل دو جمله ای در جدول 4 آمده است.

مقادیر ضریب رگرسیون معادله به دست آمده از مدل در جدول 5 نشان داده شده است.

جدول4. نتایج آنالیز واریانس ضرایب رگرسیون مدل دو جمله ای بر روی میزان استخراج کلاژن محلول از غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ضریب رگرسیون	F-value	P-value
مدل	14	401/88	28/71		287/69	0/0001
باقی مانده	15	1/55	0/11			
عدم برازش	10	1/00	0/11		1/01	0/5821
خطای خاص	5	0/55				
ضریب تغییرات				1/28		
انحراف استاندارد				0/32		
$Adj\text{-}R^2$				0/9926		
R^2				0/9962		

جدول 5. میزان معنی‌دار بودن ضرایب رگرسیون بر میزان استخراج کلاژن

پارامتر	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-value	P-value
X_1	42/14	42/14	409/08	0/0001<
X_2	1/50	1/50	14/56	0/0017
X_3	78/48	78/48	761/96	0/0001<
X_4	11/76	11/76	114/17	0/0001<
X_1X_1	237/69	237/69	2307/64	0/0001<
X_1X_2	16/81	16/81	163/20	0/0001<
X_2X_2	27/09	27/09	262/98	0/0001<
X_1X_3	0/20	0/20	1/97	0/1812
X_3X_2	0/040	0/040	0/39	0/5425
X_3X_3	14/17	14/17	137/57	0/0001<
X_4X_1	0/81	0/81	7/86	0/0133
X_4X_2	0/72	0/72	7/01	0/0182
X_3X_4	1/00	1/00	9/71	0/0071
X_4X_4	6/03	6/03	58/51	0/0001<

• بحث

بهینه‌سازی استخراج کلاژن از غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ: غلظت استیک اسید، میزان پپسین، زمان واکنش آنزیمی، pH، غلظت سود مصرفی، زمان تیمار قلیایی و دمای استخراج متغیرهای مهم مؤثر بر راندمان استخراج و خواص عملکردی کلاژن استخراج شده از غشاء داخلی پوسته تخم‌مرغ است.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل خطا نشان داد که عدم تطابق (lack of fit) در سطح اطمینان 95% معنی‌دار نبود که اعتبار مدل را تأیید می‌کند (0/5821) و در مدل‌ها هرچه ضریب تغییرات (CV) کمتر از 5 باشد، درجه بسیار بالایی از دقت و توزیع خوبی از اطمینان مقادیر آزمایشی را نشان می‌دهد(12). بر اساس نتایج جدول4 ضریب تغییرات برابر با 1/28 است. این بدین معنی است که مدل برای پیش‌بینی کردن در طیف وسیعی از متغیرهای آزمایشی کافی است. بنابراین، تمام این پارامترهای آماری نشان دهنده قابل اعتماد بودن مدل‌ها هستند.

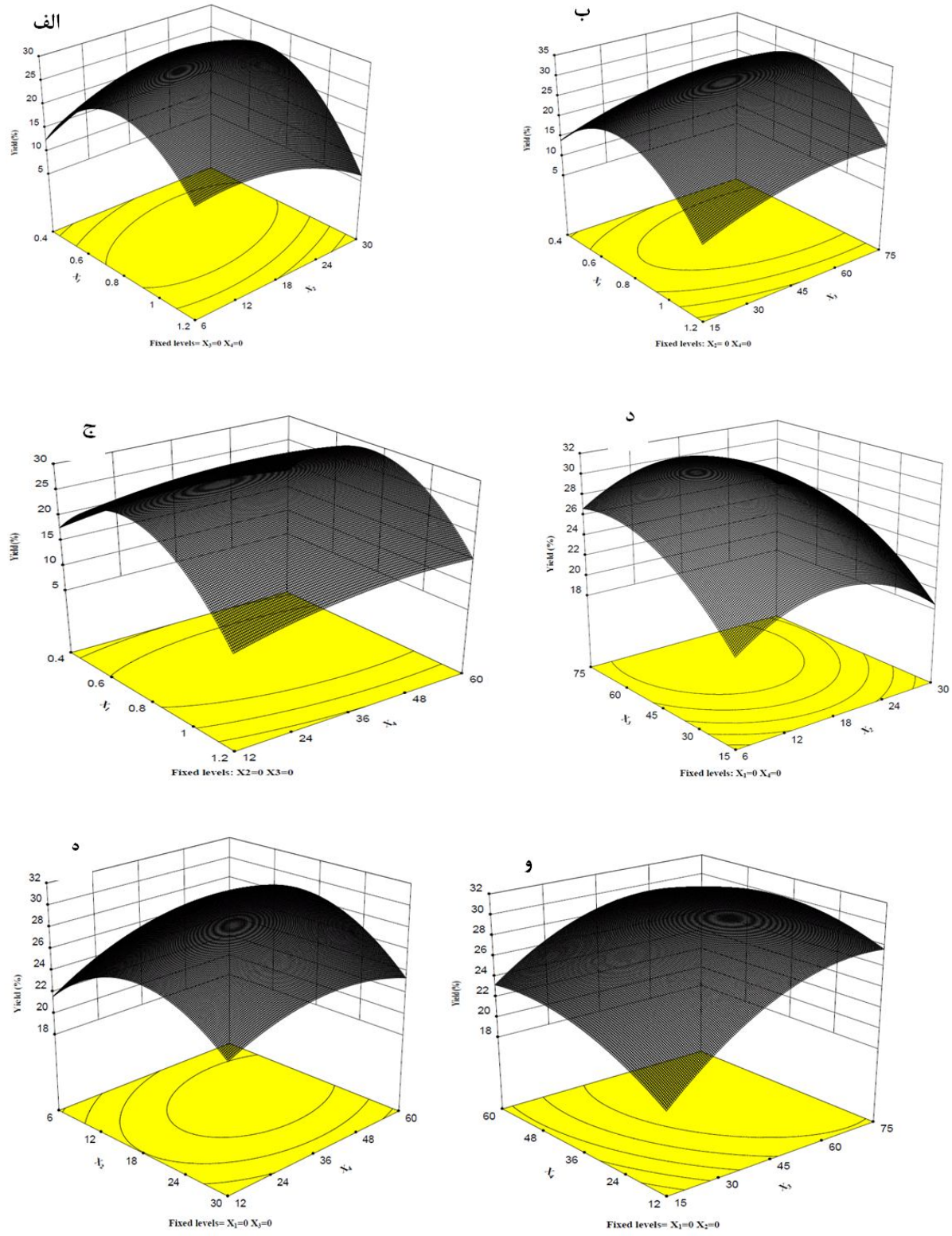
جدول5 نشان دهنده مقادیر ضریب رگرسیون معادله به دست آمده از مدل است. برای هر یک از عوامل در مدل‌ها، مقادیر کم P-value ($P<0.05$) و مقادیر زیاد F-value نشان دهنده اثر معنی‌دار بودن بر روی بازده استخراج است (13). شکل 3 نمودار سطح سه بعدی و برجسته (کانتور) در غلظت‌های مختلف آنزیم و زمان هیدرولیز آنزیمی در غلظت ثابت سود و زمان تیمار قلیایی بر سطح پاسخ نشان می‌دهد. بازدهی PSC با افزایش غلظت آنزیم تا 50U/mg افزایش می‌یابد و در زمان استخراج حدود 48 ساعت به حداکثر مقدار خود می‌رسد. لازم به ذکر است که هضم پپسین در سطح بالایی از آنزیم (بالاتر از 75 U/mg) و زمان بالای هیدرولیز (بیش از 48 ساعت) همیشه پاسخ مطلوب را نشان نمی‌دهد چرا که ممکن است به خاطر شکل‌گیری قطعات پپتیدی با وزن مولکولی پایین‌تر نتوان آنها را با NaCl رسوب داد. همچنین، این افزایش غلظت آنزیم نیز جنبه اقتصادی ندارد.

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017



شکل 1. نمودارهای سه بعدی سطح پاسخ مربوط به اثرات متقابل غلظت سود (X1)، زمان تیمار قلیایی (X2)، غلظت آنزیم (X3) و زمان هیدرولیز (X4) بر روی میزان بازدهی استخراج کلاژن

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

نتایج این تحقیق موافق با Wang و همکاران (2008) بود که گزارش کرده بودند که میزان بازدهی استخراج کلاژن از ماهی کپور علف خوار با افزایش مقدار پپسین افزایش می‌یابد (9). نتایج نشان داد که کلاژن استخراج شده با اسید استیک (0/5M) در مقایسه با استخراج کلاژن با آنزیم پپسین به طور کامل با محلول استیک اسید حل نمی‌شوند و میزان بازدهی آن نیز کمتر است(داده‌ها نشان داده نشده است). این مسئله را می‌توان بر اساس مطالعات گذشته این طور توضیح داد که مولکول‌های کلاژن غشاء پوسته به احتمال زیاد در منطقه تلوپپتید زنجیره کلاژن دارای پل‌های عرضی کووالانسی هستند که منجر به محلولیت کم کلاژن در استیک اسید می‌شود(5, 8, 14). آنزیم پپسین قادر است که به طور اختصاصی منطقه پایانی غیر زنجیره‌ای کلاژن غشای پوسته‌ی تخم‌مرغ را بدون آسیب رساندن به مارپیچ سه گانه کلاژن بشکافد. بنابراین، بازده استخراج کلاژنی که به طور جزئی شکافته شده است، افزایش می‌یابد (16، 15). بر اساس نتایج جدول 5 می‌توان دریافت که در میان چهار متغیر مستقل تعیین شده غلظت سود (X_1) و غلظت آنزیم (X_4) بیشترین اثر را بر روی مقدار کلاژن (Y%) دارد. چنین نتایج مشابهی برای استخراج کلاژن از پوست ماهی تن توسط Woo و همکاران در سال 2008 گزارش شده است. آنها در تحقیقشان غلظت هیدروکسید سدیم (0/5- 1/3 نرمال)، زمان هضم قلیایی (12-36 ساعت)، غلظت آنزیم (0/6تا 1/4 درصد)، و زمان واکنش آنزیمی (12-36 ساعت) به عنوان متغیر در پنج سطح و میزان بازدهی استخراج کلاژن به عنوان پاسخ انتخاب کردند. نتایج نشان داد که غلظت سود و غلظت آنزیم بیشترین اثر را بر روی مقدار کلاژن (Y%) دارد و بیشترین استخراج کلاژن (27/6 درصد) مربوط به تیمار غلظت هیدروکسید سدیم 0/9 نرمال، زمان هضم قلیایی 24 ساعت، غلظت آنزیم 1درصد، زمان واکنش آنزیمی24 ساعت است (17). با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که روش سطح پاسخ یک ابزار مفید برای توصیف و پیش‌بینی روند استخراج PSC از غشای داخلی پوسته‌ی تخم‌مرغ است. استفاده نمودارهای سه بعدی و کانتور در RSM برای برآورد اثر چهار متغیر مستقل (غلظت سود، زمان تیمار قلیایی، غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز) مؤثر بود. مقادیر آزمایشگاهی بازدهی PSC از 14/8 تا 30/1 درصد متغیر بود. غلظت سود 0/76 نرمال، زمان تیمار قلیایی 18 ساعت، غلظت آنزیم 50U/mg و زمان هیدرولیز 43-42 ساعت، شرایط بهینه برای استخراج PSC از غشاء پوسته تخم‌مرغ هستند که در این شرایط، بازدهی PSC 30/049 درصد به دست آمد و تحت شرایط بهینه بازدهی مدل0/06 ±30/054 درصد پیش‌بینی شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که مقادیر به دست آمده با مقادیر پیش‌بینی شده در یک راستا هستند (در سطح 0/05 در صد معنی‌دار نبود) و در نتیجه نشان داد که مدل RSM رضایت بخش و دقیق است. بنابراین می‌توان گفت که غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ یک منبع مناسب برای استخراج کلاژن است. لازم به ذکر است در مورد میزان بازدهی استخراج کلاژن از پوسته تخم‌مرغ با استفاده از آنزیم پپسین اطلاعات زیادی در پژوهش‌های پیشین موجود نیست. میزان استخراج‌های متفاوتی (برحسب ماده خشک) از کلاژن با استفاده از آنزیم پپسین در منابع مختلف ذکر شده است که شامل پوست ماهی کپور 19/3% (9)، پوست ماهی puffer ocellate 44/7% (18)، پوست گربه ماهی 38/4% (19) ، پوست ماهی black drum 15/8% (20)، ماهی چشم درشت قرمز 19/79% (16)، پوست ماهی تن 27/1% (17)، پوست ماهی بادکنکی 19/5% (15)، پوست ماهی sheephead seabream 29/3% (20) ، پوست ماهی مرکب 81/40% (21) و پوست unicorn leatherjacket 8/48% (5) است. اختلاف در منابع و روش استخراج مهم‌ترین دلایل برای توجیه این تفاوت‌ها است.

الگوی پروتئینیSDS- PAGE کلاژن: الگوی پروتئینی SDS- PAGEکلاژن محلول استخراج شده به وسیله آنزیم پپسین،کلاژن نوع I و نشانگرهای پروتئین در شکل 1 داده شده است. الگوی استخراجی در PSC شامل زنجیره‌های α_1 و α_2 که بر اساس پهنای باند به نسبت تقریبی دو به یک هستند (دو زنجیره α_1 و یک زنجیره α_2). این نتایج نشان می‌دهد که بیشترین کلاژن استخراج شده از پوسته تخم‌مرغ از کلاژن نوع I است. زیرا کلاژن نوع I در ساختار خود دارای دو زنجیره α_1 و یک زنجیره α_2 است و از فراوان‌ترین نوع کلاژن و بیشترین مطالعه در مورد آن انجام گرفته است(22). چنین نتایج مشابهی نیز برای پوست ماهی ژاپنی (23)، پوست ماهی نرم باله خوراکی اقیانوس آرام (Pacific whiting) (24)، ماهی Nile perch (11) و گربه ماهی (19)گزارش شده است با این وجود وزن مولکولی انواع زنجیره‌ها در گونه‌های مختلف و حتی با نتایج حاصل از این تحقیق اندکی متفاوت است. لازم به ذکر است که در الگوی پروتئینی، ممکن است که زنجیره α_3 وجود داشته باشد اما به دلیل اینکه این زنجیره دارای وزن مولکولی برابر با زنجیرهα_1 است، بنابراین نمی‌توان آن را تشخیص داد. همچنین نتایج حاصل از الگوی پروتئینی SDS- PAGE در استخراج PSC نشان داد که به غیر از دو زنجیره α دارای دو جزء با وزن مولکولی بالا با پیوندهای عرضی زیاد هستند که شامل زنجیره‌های β و γ است. به طور معمول کلاژن به دو

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

صورت روش اسیدی و آنزیمی استخراج می‌شود که در ساختار کلاژن آنها تفاوت‌هایی دارد. برای مثال، حرکت الگوی پروتئینی کلاژن استخراج شده در روش آنزیمی سریع‌تر روش استخراج اسیدی است(وزن مولکولی کلاژن استخراج شده به روش اسیدی بالاتر است). زیرا آنزیم پپسین قادر است که پیوندهای عرضی و ناحیه تلوپپتید زنجیره‌های βکه دارای وزن مولکولی بالا هستند را شکسته و همزمان به زنجیره‌های کوتاه α تبدیل کند. بنابراین، مقدار کمی از زنجیره‌هایی با وزن مولکولی بالا مانند زنجیره‌های β (دیمر زنجیره‌های آلفا) باقی می‌مانند (23). با افزایش سن حیوان و عدم خوراک مناسب میزان پیوندهای عرضی درون مولکولی و بین مولکولی زنجیره‌های کلاژن افزایش یافته و وزن مولکولی کلاژن افزایش می‌یابد (15).

ترکیب اسیدهای آمینه کلاژن: فراوان‌ترین اسید آمینه در ساختار کلاژن گلایسین است که حدود یک سوم از کل اسیدهای آمینه کلاژن را تشکیل می‌دهد و به صورت زنجیره $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$ در ساختار کلاژن تکرار می‌شود. بعد از گلایسین به ترتیب بیشترین مقدار اسیدهای آمینه کلاژن استخراج شده شامل پرولین، آلانین، هیدروکسی پرولین و آرژنین است. وجود عوامل و شرایطی می‌تواند بر پایداری و شکل ساختمانی کلاژن اثر گذار باشند؛ برای مثال، وجود اسیدهای آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین در زنجیره پپتیدی از ایجاد حالت مارپیچی در قسمتی از زنجیره که آنها قرار گرفته‌اند، جلوگیری می‌کند. علت آن این است که در این اسیدهای آمینه(پرولین و هیدروکسی پرولین) که در واقع ایمینواسید هستند، حلقه پیرولیدین موجود در هر دو اسید آمینه باعث می‌شود که وقتی در تشکیل زنجیره پپتیدی شرکت می‌کند دیگر هیدروژنی ندارد که با اکسیژن اسید آمینه شماره چهارم زنجیره شرکت کند ولی به دلیل گروه هیدروکسیل موجود در ساختار این دو اسید آمینه از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی بین زنجیرهای باعث پایداری ساختاری مارپیچ سه گانه کلاژن می‌شود. مقدار ایمینواسید در ساختار کلاژن بر روی پایداری حرارتی کلاژن نقش مهمی دارد، به طوری که هر چه قدر این مقدار بیشتر باشد، دمای دناتوراسیون کلاژن بیشتر است. مقدار ایمینواسیدها در هر منبعی بستگی به شرایط محیط موجود زنده مانند دما دارد. برای مثال، کلاژن استخراج شده از گونه‌های ماهی که در مناطق سردسیری زندگی می‌کنند مقدار اسید آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین کمتری نسبت به ماهیان مناطق گرمسیری دارد. بنابراین، کلاژن استخراج شده در دمای پایین‌تری دناتوراسیون می‌شوند (5). با مقایسه نتایج به دست آمده با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه مشخص شد که مقدار ایمینواسیدها در کلاژن استخراج شده از غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ کمتر از کلاژن پوست گاو و بیشتر از انواع ماهیان مورد مطالعه است (17، 15). نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که غلظت سود، غلظت آنزیم، زمان تیمار قلیایی و زمان هیدرولیز از فاکتورهای مؤثر بر استخراج کلاژن از پوسته تخم‌مرغ است.با توجه به ظرفیت بالای تولید پوسته تخم‌مرغ در کشور و عدم وجود مشکلات ذکر شده، این منبع می‌تواند به عنوان جایگزین مناسب برای تولید کلاژن مورد استفاده قرار گیرد که ژلاتین حاصل از آن در صنعت غذا کاربردهای گوناگونی دارد.

اثر pH و غلظت NaCl بر محلولیت کلاژن: دانستن محلولیت پروتئین‌ها برای دستیابی به عملکرد آنها ضروری است. مهم‌ترین عوامل مؤثر بر محلولیت پروتئین شامل ترکیب آمینواسید، توالی آمینواسیدها، بار سطحی پروتئین، تا شدن پروتئین، تعادل هیدروفوبیک-هیدروفیلیک در سطح پروتئین ،pH، قدرت یونی دما و حلال استفاده شده است. شکل 2 تأثیر pH و NaCl را بر محلولیت کلاژن استخراج شده از غشای پوسته تخم‌مرغ در استیک اسید 0/5 مولار را نشان می‌دهد. میزان محلولیت کلاژن در دامنه pH بین 1 تا 4 افزایش و بیشترین محلولیت در pH برابر با 3 مشخص شده است (شکل 2-الف). در pH بالای 4 محلولیت کلاژن کاهش چشمگیری یافته و تاpH خنثی نیز این کاهش ادامه می‌یابد. اگرچه در دامنه قلیایی با افزایشpH تا 10 محلولیت اندکی افزایش یافت. Foegeding و همکاران در سال 1996 گزارش کردند که کلاژن دارای محدوده نقاط ایزوالکتریک بین pH 6 تا 9 است (25). در pH نقطه ایزوالکتریک با توجه به افزایش پیوندهای هیدروفوبیک- هیدروفوبیک، پروتئین دارای کمترین حد انحلال پذیری بوده و آگلوتینه شدن و رسوب پروتئین رخ می‌دهد. در صورتی که مقدار pH بیشتر یا کمتر از نقطه ایزوالکتریک باشد، انتظار می‌رود تشکیل شبکه باردار پروتئینی که بار مثبت در پائین و بار منفی در بالای نقطه ایزوالکتریک تشکیل شود. بنابراین، محلولیت کلاژن افزایش می‌یابد(25). انحلال‌پذیری کلاژن استخراج شده توسط آنزیم پپسین در استیک اسید 0/5 مولار و در حضور 1 تا 2 درصدNaClدارای بیشترین محلولیت و در این غلظت‌ها محلولیت نیز ثابت باقی ماند. هنگامی که غلظت NaCl به بیش از 2 درصد رسید، محلولیت کلاژن به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. کاهش محلولیت در غلظت‌های بالای 2درصد NaCl مربوط به اثر پدیده خروج نمک (salting-out) است که ناشی از کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

پیوندهای هیدروژنی بین آب و پروتئین(عامل حل شدن مناسب پروتئین) است(5).

تفاوت در محدوده pH و غلظت NaCl مؤثر در محلولیت کلاژن در منابع مختلف به تفاوت در ساختار مولکولی کلاژن (نوع کلاژن و مقدار آنها)، شرایط استخراج و منبع تهیه کلاژن بستگی دارد. اثر pH و غلظت NaCl بر میزان محلولیت کلاژن استخراج شده با استفاده از آنزیم پپسین و اسید در پوست ماهی سرخو چشم درشت توسط Jongjareonrak و همکاران در سال 2005 مورد مطالعه قرار گرفت(8). نتایج میزان محلولیت کلاژن در هر دو نوع استخراج نشان داد که بیشترین محلولیت در pH=4 و غلظت 3 درصد NaCl رخ داد و در pH کمتر از 4 و غلظت کمتر از 3 درصد NaCl میزان محلولیت کلاژن در هر دو نوع استخراج کاهش می‌یابد؛ ولی با این وجود، میزان محلولیت روش استخراج با آنزیم بالاتر بود. علت افزایش محلولیت در روش استخراج آنزیم آن است که آنزیم پپسین قادر است به طور اختصاصی منطقه پایانی غیر زنجیرهای کلاژن را بدون آسیب رساندن یکپارچگی مارپیچ سه گانه کلاژن بشکافد. بنابراین، علاوه بر آنکه بازدهی استخراج افزایش پیدا کرد، میزان محلولیت نیز در pH و غلظت NaCl مختلف نسبت به روش اسیدی افزایش یافت.بنابرین می‌توان نتیجه گرفت که کلاژن استخراجی از پوسته تخم با توجه به میزان بازدهی بالا، می‌تواند به عنوان یک منبع مناسب برای تهیه کلاژن معرفی کرد بدون اینکه مشکلات فوق‌الذکر را داشته باشد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور به دلیل حمایت‌های مالی، صمیمانه قدردانی می‌شود.

• References

1. Iranian Laying Hen Farmers Federation. http:// www.iran-lff.com [in persian] .(2013).
2. Nys Y, Bain M, Van Immerseel F. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg chemistry, production and consumption: Elsevier; 2011.
3. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. Journal of cell science. 2005;118(7):1341-53.
4. King'Ori A. A review of the uses of poultry eggshells and shell membranes. Int J Poult Sci. 2011;10(11):908-12.
5. Ahmad M, Benjakul S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (Aluterus monocerous). Food Chemistry. 2010;120(3):817-24.
6. Heu MS, Lee JH, Kim HJ, Jee SJ, Lee JS, Jeon Y-J, et al. Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from flatfish skin. Food Science and Biotechnology. 2010;19(1):27-33.
7. Zhao Y-H, Chi Y-J. Characterization of collagen from eggshell membrane. Biotechnology. 2009;8(2):254-8.
8. Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (Lutjanus vitta). Food Chemistry. 2005;93(3):475-84.
9. Wang L, Yang B, Du X, Yang Y, Liu J. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (Ctenopharyngodon idella) by response surface methodology. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2008;9(4):604-7.
10. Bowser J, Elder S, Pasquali M, Grady J, Rashmir-Raven A, Wills R, et al. Tensile properties in collagen-rich tissues of Quarter Horses with hereditary equine regional dermal asthenia (HERDA). Equine veterinary journal. 2014;46(2):216-22.
11. Muyonga J, Cole C, Duodu K. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (Lates niloticus). Food Chemistry. 2004;85(1):81-9.
12. Song Y, Du B, Zhou T, Han B, Yu F, Yang R, et al. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary structural analysis of polysaccharides from defatted peanut (Arachis hypogaea) cakes. Carbohydrate research. 2011;346(2):305-10.
13. Quanhong L, Caili F. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. Food chemistry. 2005;92(4):701-6.
14. Zhang Y ,Liu W, Li G, Shi B, Miao Y, Wu X. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (Ctenopharyngodon idella). Food chemistry. 2007;103(3):906-12.
15. Huang Y-R, Shiau C-Y, Chen H-H, Huang B-C. Isolation and characterization of acid and pepsin-

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

solubilized collagens from the skin of balloon fish (Diodon holocanthus). Food Hydrocolloids. 2011;25(6):1507-13.

16. Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (Priacanthus tayenus). Food Chemistry. 2007;104(2):593-601.

17. Woo J-W, Yu S-J, Cho S-M, Lee Y-B, Kim S-B. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (Thunnus albacares) dorsal skin. Food Hydrocolloids. 2008;(22): 879-887.

18. Nagai T, Suzuki N. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (Argonauta argo, Linnaeus) outer skin. Food Chemistry. 2002;76(2):149-53.

19. Liu H, Li D, Guo S. Studies on collagen from the skin of channel catfish (Ictalurus punctaus). Food Chemistry. 2007;101(2):621-5.

20. Ogawa M, Moody MW, Portier RJ, Bell J, Schexnayder MA, Losso JN. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. Journal of Agricultural and food Chemistry. 2003; 8088-92.

21. Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, Balasubramanian T. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (Doryteuthis singhalensis). Food Hydrocolloids. 2015;43:708-16.

22. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. Advanced drug delivery reviews. 2003;55(12):1531-46.

23. Nagai T, Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. Food Chemistry. 2000;68(3):277-81.

24. Kim JS, Park J. Characterization of Acid-soluble Collagen from Pacific Whiting Surimi Processing Byproducts. Journal of food science. 2004;69(8).

25. Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (Priacanthus tayenus). Food chemistry. 2005;89(3):363-72.

www.SID.ir

Archive of SID

Optimization of Extraction and Determination of Physicochemical Properties of Collagen from Eggshell Membrane

*Mohammadi R[1], Taghi Zadeh M[2], Askari F[2], Moradi Sh[3], Mohammadifar MA[4], Ferdosi R[5], Mortazavian AM[*6]*

1- Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Public Health, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2- MSc Student in Food Science, Faculty of Health, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran

3- Master of Food Science, Faculty of Health, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran

4- Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5-Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*6- *Corresponding author: Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: mortazvn@sbmu.ac.ir*

Received 7 Mar, 2016 **Accepted 24 Jun, 2016**

Background and Objectives: Collagen is a protein with several applications in the pharmaceutical, cosmetic, medical and food industries that is prepared from different sources such as cow, pig, poultry and fish. In this study, optimization of the extraction of collagen from eggshell membrane was examined.

Materials and Methods: The efficiency of extraction of collagen in different concentrations of sodium hydroxide (2/0-2 /1 N) at different treatment times periods (6-36 hours), different concentrations of pepsin (U/mg90-15) and enzymatic hydrolysis times (6-60 hours) was studied with response surface methodology (RSM). Also the properties of eggshell membrane collagen were characterized by amino acid analyzer, SDS- PAGE and solubility.

Results: The most important factors for extraction of collagen using RSM according to central composite design were optimized. Optimum extraction conditions were as follows: NaOH concentration of 0.76 N, alkali treatment time of 18 h, enzyme concentration of 50 U/mg and hydrolysis time of 43.42 h. The experimental extraction yield under optimal conditions was found to be 30.049%. Collagen solubility in pH=3 and NaCl concentration of less than 2% was determined. The analysis showed that Glycine having 322/1000 amino acids as the most amino acids and the immune-acid (sum of Proline and hydroxylproline) of collagen was 19.5 %. SDS- PAGE protein pattern revealed two different a (α1 and α2) components with β and γ chains.

Conclusion: Collagen was extracted from eggshell membrane with optimum extraction efficiency, which can be used in film production, gelatin and functional food components to maintain health and control chronic diseases.

Keywords: Extraction, Collagen, Response surface methodology, Physicochemical characteristics

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 16:50 +0430 on Tuesday July 4th 2017

www.SID.ir