

## شرایط بهینه استخراج ژلاتین خوراکی از استخوان گاو به روش اسیدی با استفاده از رگرسیون سطوح پاسخ RSREG

سید هاشم حسینی پرور، جواد کرامت و مهدی کدیور<sup>۱</sup>

### چکیده

در این تحقیق به منظور تعیین شرایط بهینه استخراج ژلاتین به روش اسیدی از استخوان گاو، به ترتیب اثر سه متغیر pH (۲/۶-۱/۸)، دما (۸۰-۶۰ درجه سانتی گراد)، زمان (۱۲۰-۴۰ دقیقه) بر روی راندمان استخراج، استحکام ژل، ویسکوزیته و میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طرح آزمایشی مرکب مرکزی انجام شده به روش رگرسیون سطوح پاسخ (RSREG) تجزیه و تحلیل شد. ضرایب هم بستگی مدل‌های رگرسیون برازش داده شده راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به ترتیب ۰/۹۹۰، ۰/۹۱۱، ۰/۹۹۸ و ۰/۹۲۸ تعیین شد. آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند در مدل‌های رگرسیون نشان داد که اثر هر سه متغیر pH، دما و زمان در مدل‌های رگرسیون راندمان و ویسکوزیته معنی دار بوده اما اثر دما در مدل رگرسیون استحکام ژل و اثر pH در مدل رگرسیون جذب معنی دار نبودند. مقایسه میانگین نتایج خصوصیات ژلاتین‌های اسیدی و تجارتي نشان داد که ژلاتین اسیدی دارای ویسکوزیته و بلوم بیشتری نسبت به ژلاتین تجارتي بود. شرایط اپتیمم استخراج برای حداکثر راندمان، استحکام ژل و ویسکوزیته و حداقل جذب بترتیب (pH=۱/۸۸، ۸۰ درجه سانتی گراد، ۱۱۸ دقیقه)، (pH=۱/۸۸، ۶۰ درجه سانتی گراد، ۴۸ دقیقه)، (pH=۲/۵۶، ۶۹ درجه سانتی گراد، ۱۱۸ دقیقه) و (pH=۲/۶، ۶۲ درجه سانتی گراد، ۴۸ دقیقه) تعیین شد. نتایج آنالیز واریانس مقادیر آهن، مس و سرب در نمونه ژلاتین تجارتي و اسیدی نشان داد که اختلاف معنی داری بین نمونه‌ها وجود داشت، ولی مقدار عناصر فوق در نمونه اسیدی کمتر از حد مجاز در ژلاتین غذایی بود. ترکیب آمینواسیدی ژلاتین اسیدی و ژلاتین تجارتي تقریباً یکسان بود.

واژه‌های کلیدی: ژلاتین، استخوان، استخراج اسیدی، رگرسیون سطوح پاسخ

### مقدمه

(United States Pharmacopeia)(USP) در سال ۱۹۹۰، ژلاتین

عبارت است از محصول به دست آمده از هیدرولیز جزئی کلاژن پوست، بافت پیوندی سفید و استخوان دام‌ها (۱۲). پیروان ادیان اسلام و یهودیت ژلاتین حاصل از خوک را مصرف

ژلاتین عبارت است از یک پلی پپتید با وزن ملکولی بالا که از کلاژن بافت‌های پیوندی، پوست، استخوان و رباط‌ها مشتق می‌شود (۸ و ۱۲). طبق تعریف یو اس پی

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیاران علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

نمی‌کنند و ژلاتین حاصل از پوست و استخوان گاو را در صورتی مصرف می‌کنند که کشتار مطابق الزامات دینی صورت گرفته باشد (۵). از جمله خصوصیات ژلاتین حلالیت در آب، چسبندگی (Adhesiveness)، تشکیل ژل، تشکیل کف، تشکیل فیلم (Film forming)، محافظت از کلوئید (Colloid protection)، امولسیون‌کنندگی و خصوصیات تغذیه‌ای (Nutritional properties) می‌باشند. خصوصیات عملکردی ژلاتین (Gelatin functional properties) عبارتند از استحکام ژل و ویسکوزیته (۸، ۴ و ۱۲).

ژلاتین دارای کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی می‌باشد. در فرآورده‌های قنادی (دسر ژله‌ای و ژله‌های قنادی) و فرآورده‌های قنادی هوادهی شده (مارشمالو، آدامس‌های میوه‌ای (Fruit chews)، تافی‌ها و شیرینی بادامی)، در فرآورده‌های لبنی (ماست‌ها، شیرهای تخمیری حرارت دیده، دسرهای ژله‌ای طعم‌دار شیر، دسرهای خامه‌ای (Dessert creams)، بستنی‌ها و آیسینگ‌ها)، در فرآورده‌های گوشتی (ران پخته شده تحت فشار (Cooked pressed)، فرآورده‌های گوشتی کنسروی، امولسیون‌های گوشتی و ژله‌های تزئینی) و کاربردهای گوناگون ژلاتین (سس‌های امولسیفیه شده، تصفیه آب میوه‌ها و ریز پوشینه کردن طعم‌ها (Flavor microencapsulation)) (۸).

چهار روش تولید ژلاتین وجود دارد که عبارتند از: روش اسیدی، روش قلیایی، روش پراکسید هیدروژن و روش آنزیمی (۱۱ و ۲۰). نصراله و همکاران در سال ۱۹۹۳، راندمان و کیفیت ژلاتین استخراجی به روش اسیدی را به وسیله پیش تیمار مواد خام حاوی کلاژن در دماهای پائین و زمان‌های کوتاه و نیز به دست آوردن نسبت مطلوب آب و مواد اولیه در هنگام استخراج بهبود بخشیدند. طبق نظر آنها بهترین نسبت آب به مواد اولیه حاوی کلاژن بین ۱/۵ تا ۲/۵ برابر، ترجیحاً ۲/۲ برابر بوده، هم‌چنین دما و pH بهینه استخراج به ترتیب ۶۶/۶ درجه سانتی‌گراد و ۱/۵ تا ۲ بوده است (۱۸). علاوه بر این، هم‌زدن ملایم (Mild agitation) مخلوط، هنگام استخراج سبب افزایش راندمان تولید می‌گردد (۸). موی و همکاران در سال ۱۹۹۵،

فرایند مداومی برای تهیه ژلاتین از پودر استخوان به روش اسیدی طراحی نمودند (۱۷). در این روش عمل ملح زدائی در دمای حدود ۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تیمار اسیدی با اسید سولفوریک انجام شده و pH مخلوط نیز در هنگام استخراج با اسید سولفوریک ۴ نرمال در حدود ۲/۲ ثابت نگهداشته شد. دمای استخراج حدود ۷۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد (۱۷). هولزر (Holzer) در سال ۱۹۹۶، ژلاتینی با درجه بلوم بیش از ۳۰۰ و با راندمان استحصال بالا از پوست ماهی به روش قلیایی تهیه کرد. (درجه بلوم مطابق استاندارد شماره ۷۵۷ مؤسسه استاندارد انگلستان (۱۳) تعیین می‌گردد). او اثر غلظت‌های مختلف سوسپانسیون شیر آهک و هم‌چنین زمان‌های تیمار قلیایی را بر روی کیفیت و راندمان ژلاتین استحصالی مورد بررسی قرار داد (۱۱). رولاندز و همکاران در سال ۲۰۰۰، فرایند جدیدی برای تولید ژلاتین با خلوص بالا، با استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک از استخوان ملح زدائی شده (اوسئین) ارائه کردند. در این روش ژلاتینی با رنگ خیلی کم و استحکام ژل بالا با انواع ویسکوزیته تولید شد. در روش آنزیمی تولید ژلاتین با خلوص بالا انجام شده و زمان تولید ژلاتین به دلیل حذف و یا کوتاه کردن مرحله آهک‌زنی کاهش می‌یابد (۲۱).

امروزه به منظور بهینه‌سازی فرایندهای مختلف مواد غذایی از روش‌های مدل‌سازی استفاده می‌شود. مدلینگ فرایند به‌منظور بررسی و درک چگونگی تأثیر متغیرهای مستقل بر روی خصوصیات محصول تولیدی طی آن فرایند انجام می‌گیرد. مدل‌سازی این امکان را به ما می‌دهد که تأثیر هر یک از متغیرهای مذکور را بدون حذف اثر متغیر دیگر بر روی خصوصیات محصول تولیدی به‌صورت توابع ریاضی نشان دهیم، در این حالت با استفاده از مدل می‌توان شرایط مطلوب و بهینه فرایند را پیشگویی نمود (۶ و ۷).

هدف از این تحقیق، تعیین شرایط بهینه تولید ژلاتین به روش اسیدی و تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از روش رگرسیون سطوح پاسخ بود.

## مواد و روش‌ها

### الف) مواد و تجهیزات

استخوان گاو از شرکت فراورده‌های گوشتی صنوبر، ژلاتین تجارتي از شرکت بیگروف (Begerov)، مواد شیمیایی شامل، دی اتیل اتر از شرکت پارس شیمی، هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک، اسید سولفوریک، هیدروکسید کلسیم، سولفات آلومینیم، اسید فسفریک، کربن اکتیو، کاتالیزور کلدال (مخلوط همگنی از ۱۰۰ گرم سولفات پتاسیم هیدراته، ۱۰ گرم سولفات مس هیدراته و ۱ گرم سلنیم) از شرکت مرک آلمان و رزین تعویض یونی کاتیونی پورولیت سی ۱۰۰ (Purolite C100 Strongly acid cation ion exchanger)) از شرکت زیگما تهیه شد. تجهیزات مورد استفاده عبارت بودند از: آسیاب چکشی، دستگاه اینستران برای اندازه‌گیری خصوصیات بافت (مدل ۱۱۴۰، ساخت شرکت اینستران (Instron) انگلستان)، آون معمولی (ساخت شرکت هراوس (Heroeus) آلمان)، ترازوی آزمایشگاهی با دقت  $\pm 0.0001$ ، ساخت شرکت شیمادزو (Shimadzu) ژاپن، دستگاه ویسکومتر بروکفیلد (Brookfield) ساخت آمریکا، هات پلیت مجهز به همزن مغناطیسی (ساخت شرکت روهر آلمان)، دستگاه اندازه‌گیری پروتئین میکروکلدال ساخت شرکت بوخی (Buchi) سوئد (شامل بخش‌های هضم و تقطیر)، دستگاه pH متر مدل ۷ (ساخت شرکت کورنینگ ایل انگلستان (CORNING-EEL))، دستگاه اسپکتروفتومتر کم اسپک (Camspec) مدل ۳۵۰ (دوپرتویی، ماورای بنفش - مرئی، ساخت انگلستان)، دستگاه تبخیر کننده چرخان تحت خلاء (ساخت شرکت هیدولف (Heidolph) آلمان)، دستگاه سانتیفریوژ سیگما مدل ۳ ای-۱ (Sigma 3E-1) ساخت آلمان، رفرکتومتر رومیزی مدل کارلزیس (Carlzeiss)، پمپ خلأ مسترکول ساخت آمریکا، دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (پرکین - المر (Pekin Elmer) مدل ۲۳۸۰ ساخت آمریکا). ترکیب آمینو اسیدی ژلاتین‌های تولیدی و تجارتي توسط دستگاه آمینو اسید آنالیزر سازمان انرژی اتمی تهران انجام شد.

### ب) روش استخراج و خالص‌سازی ژلاتین

مراحل استخراج ژلاتین در سه بخش انجام شد که عبارت بود از: آماده‌سازی نمونه‌های آزمایشی، آنالیز ترکیبات استخوان، انجام مراحل استخراج اسیدی، خالص‌سازی محلول‌های ژلاتین حاصل و سپس تعیین راندمان استخراج، بلوم، ویسکوزیته و جذب نمونه‌ها و نهایتاً مدلینگ فرایند استخراج اسیدی. انتخاب بهترین نمونه ژلاتین به لحاظ راندمان و خصوصیات عملکردی و مقایسه ویژگی‌های آن از قبیل: بلوم، ویسکوزیته، آنالیز آمینو اسیدی و میزان خلوص (درصد خاکستر، سرب، آهن، مس و کلسیم) آن با ژلاتین تجارتي انجام شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها - مقدار ۳۰ کیلوگرم از استخوان‌های تهیه شده، ابتدا توسط ساتور به قطعات چند سانتی متری خرد شده، سپس استخوان‌های خرد شده به وسیله دستگاه آسیاب چکشی به ذرات ۱ تا ۳ میلی متر تبدیل شدند. پس از مخلوط کردن استخوان‌های خرد شده نمونه‌های آزمایشی ۲۰۰ گرمی استخوان، در نایلون‌های پلاستیکی بسته‌بندی شده و در سردخانه ۲۱- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری ترکیبات استخوان - اندازه‌گیری‌های اساسی (Proximate analysis) برای تعیین ترکیبات اصلی به کار برده می‌شود. ترکیبات استخوان مورد استفاده در این تحقیق از نظر میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین شد (۹ و ۱۷).

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 و سپس در مرحله بعد با آب با دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد این عمل دوباره تکرار شد، طی این دو مرحله قسمت اعظم چربی موجود در استخوان خارج شد و مقدار اندک چربی باقی‌مانده طی مرحله ملح زدائی استخوان از آن خارج شد (۱۵). ملح زدائی استخوان به منظور ملح زدائی کردن استخوان، بر روی نمونه استخوان چربی‌گیری شده (حدود ۲۰۰ گرم)،

جدول ۱. متغیرهای فرایند استخراج اسیدی و سطوح آنها در طرح قابل چرخش مرکب مرکزی

متغیر	نماد	سطوح کدبندی شده متغیر		
		-۱	۰	+۱
pH	X <sub>1</sub>	۱/۸	۲/۲	۲/۶
دمای استخراج (درجه سانتی گراد)	X <sub>2</sub>	۶۰	۷۰	۸۰
زمان استخراج (دقیقه)	X <sub>3</sub>	۴۰	۸۰	۱۲۰

درصد، pH محلول به ۷/۵ رسانده شد و آنگاه تا رسیدن به pH = ۵/۵، اسید فسفریک ۱۰ درصد اضافه شد. در این حالت ذرات ناخالصی در محلول ژلاتین ناپایدار شده و به وسیله سانتریفوژ نمودن در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و سپس در طی چند مرحله با عبور از کاغذ صافی توسط قیف بوخنر جدا شدند. به محلول ژلاتین حاصل، به منظور بوگیری ۰/۶ گرم کربن اکتیو اضافه شده و به خوبی مخلوط شد و سپس به وسیله سه مرحله گذراندن از کاغذ صافی توسط قیف بوخنر صاف گردید. به منظور جداسازی مواد معدنی باقی مانده در محلول ژلاتین صاف شده، از ستون رزین تعویض یونی کاتیونی (پورولیت سی ۱۰۰) عبور داده شد. محلول ژلاتین شفاف حاصل به منظور انجام آزمایش‌های کمی و کیفی مورد استفاده قرار گرفت (۱۰، ۱۹ و ۲۰).

### ج) ارزیابی کمی و کیفی ژلاتین‌های اسیدی و تجارتي

#### ۱. تعیین راندمان استخراج

به منظور تعیین راندمان استخراج هر یک از تیمارهای استخراج به روش اسیدی و ژلاتین تجارتي، از رابطه اندیس رفاکتومتری و غلظت استفاده شد. به این صورت که بریکس محلول ژلاتین خالص سازی شده به وسیله رفاکتومتر قرائت شد، سپس با قرار دادن عدد بریکس در رابطه زیر غلظت ژلاتین در محلول محاسبه گردید (۱۸):

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

#### ۲. تعیین استحکام ژل

اندازه‌گیری استحکام ژل حاصل از ژلاتین‌های اسیدی و تجارتي مطابق استاندارد شماره ۷۵۷ انگلستان با استفاده از

مقدار ۱۴۲۸ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک با غلظت ۵۰ گرم در لیتر اضافه شد و در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد مخلوط حاصل به مدت دو ساعت هم زده شد. پس از 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 (۱۶ و ۱۸).

استخراج به روش اسیدی - pH اوسئین به دست آمده از مرحله قبل، به وسیله افزودن محلول اسید سولفوریک ۴ نرمال برابر با ۱/۸، ۲/۲ و ۲/۶ تنظیم شده و در دماهای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ دقیقه عمل استخراج با آب انجام گرفت. لازم به ذکر است که نسبت آب افزوده شده به اوسئین ۲/۲ برابر بود. عمل استخراج در pH و دمای ثابت انجام شد. پس از پایان زمان استخراج، فاز محلول که در واقع محلول ژلاتین بود توسط صافی و قیف بوخنر جدا شده و پس از طی مراحل خالص‌سازی مورد ارزیابی کمی و کیفی قرار گرفت (۶ و ۱۶). متغیرهای فرایند استخراج اسیدی و سطوح آنها در طرح قابل چرخش مرکب مرکزی (CCRD) (Central Composite Rotatable Design) به صورت کدبندی شده در جدول ۱ ارائه شده‌اند. علت ثابت نگه داشتن متغیرهای فرایند در استخراج اسیدی، حذف اثرات متقابل احتمالی آنها بر روی یکدیگر بوده است. بنابراین با استقلال این متغیرها می‌توان اثر آنها را بر روی متغیرهای تابع (راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب) مورد ارزیابی قرار داد.

خالص‌سازی محلول ژلاتین - به محلول‌های ژلاتین حاصل، تا رسیدن به pH = ۹، محلول هیدروکسید کلسیم با درجه بومه ۶ افزوده شد. سپس با افزودن محلول سولفات آلومینیم ۲۵

محلول ۶/۶۷ درصد تهیه شده و در یک حمام آب گرم در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد. سپس به منظور ایجاد ژل به سرعت آن را سرد نموده و ژل حاصل در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت زمان رسیدگی را طی کرد. در مرحله بعد ۵ قطره از مخلوط ۷۵ درصد کلروفرم و ۲۵ درصد رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز (کربن تتراکلراید) بر روی ژل‌ها ریخته شد، سپس ژل‌ها در یک حمام آب گرم ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و به‌گونه‌ای حرارت داده شد که هر دقیقه، دما حدود ۰/۲ تا ۰/۴ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد. نقطه ذوب ژلاتین، دمایی بود که قطرات رنگ آزادانه درون ژل شروع به پایین رفتن نمودند (۵ و ۸).

#### ۷. اندازه‌گیری مقدار سرب، آهن و مس

اندازه‌گیری مقدار سرب، آهن و مس با استفاده از دستگاه جذب اتمی انجام شد. ابتدا از محلول‌های استاندارد اصلی آهن، مس و سرب غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ پی پی ام تهیه شد. سپس نمونه‌های ژلاتین خاکستر شده، و خاکستر حاصل به وسیله شستشو با ۱ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ و سپس ۲ میلی‌لیتر اسید نیتریک رقیق به یک ظرف حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد. پس از آن نمونه حل شده به یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و به حجم رسید. پس از تهیه نمونه‌ها و استانداردها، مقادیر جذب آنها برای عناصر مس، آهن و سرب به ترتیب در طول موج‌های ۳۲۴/۷، ۲۴۸/۳، ۲۱۷/۶ نانومتر و به وسیله دستگاه جذب اتمی خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین معادله رگرسیون، غلظت هر یک از عناصر فوق در نمونه‌های مورد آزمایش تعیین و گزارش شد (۲).

#### د) طرح آزمایشی و روش آنالیز نتایج

آزمایش‌های استخراج ژلاتین بروش کاملاً تصادفی در قالب طرح قابل چرخش مرکب مرکزی با سه تکرار در نقطه مرکزی برای ۳ متغیر و در ۳ سطح انجام شد. نتایج تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری SAS بروش رگرسیون سطوح پاسخ

دستگاه اینستران انجام گرفت. برای تهیه نمونه ژل، ابتدا یک محلول ۶/۶۷ درصد ژلاتین تهیه شد و سپس تا رسیدن به دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه بر روی حمام آب داغ قرار داده شد، محلول ژلاتین به طور کامل همزده شده و به مدت ۱۷ ساعت در دمای  $1 \pm 10$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان رسیدگی ژل، استحکام ژل با استفاده از پلانجر با قطر ۱۲/۷ میلی‌متر و مقدار نفوذ ۴ میلی‌متر پلانجر به درون ژل، مقدار بلوم بر حسب گرم اندازه‌گیری شد (۱۳ و ۱۸).

#### ۳. اندازه‌گیری ویسکوزیته

اندازه‌گیری ویسکوزیته ژلاتین‌ها نیز به روش استاندارد و با استفاده از دستگاه ویسکومتر بروکفیلد انجام شد. ابتدا یک محلول ۶/۶۷ درصد ژلاتین تهیه شد و در یک بشر ۶۰۰ میلی‌لیتری، توسط اسپیندل (Spindle) شماره ۱، با میزان ۶۰ دور در دقیقه (RPM) و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مقدار ویسکوزیته محلول ژلاتین بر حسب واحد سانتی‌پواز (Centi Poise) اندازه‌گیری شد (۸ و ۹).

#### ۴. ارزیابی رنگ محلول ژلاتین

به منظور ارزیابی رنگ محلول‌های ژلاتین، میزان جذب آنها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. جذب محلول‌های ژلاتین با غلظت یک درصد در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دوپرتویی (Double-beam) اندازه‌گیری شد (۲۰).

#### ۵. اندازه‌گیری pH ژلاتین

اندازه‌گیری pH ژلاتین با استفاده از دستگاه pH متر انجام شد. بدین صورت که ابتدا یک محلول ۱ درصد ژلاتین تهیه شد و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از تنظیم دستگاه مقدار pH اندازه‌گیری شد (۸).

#### ۶. اندازه‌گیری نقطه ذوب

به منظور اندازه‌گیری نقطه ذوب نمونه‌های ژلاتین ابتدا یک

بر خلوص ژلاتین تولید شده موثر می‌باشد.

### مدل سازی فرایند استخراج اسیدی ژلاتین

نتایج اندازه‌گیری راندمان استخراج، بلوم، ویسکوزیته و جذب محلول ژلاتین حاصل از استخراج اسیدی در طول موج ۴۲۰ نانومتر در سطوح مختلف pH، دما و زمان در جدول ۲ ارائه شده است. مدل رگرسیون حاصل از برازش نتایج ارائه شده در جدول ۲ برای هر یک از متغیرهای تابع (راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب) دارای ضرایبی می‌باشد که در جدول ۳ ارائه شده است. آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر روی مدل‌های رگرسیون نشان داد که در دو مدل رگرسیون راندمان ویسکوزیته، اثر متغیرهای pH، دما و زمان معنی‌دار شده‌اند. این در حالی است که در مدل رگرسیون جذب پرتو، اثر متغیر pH و در مدل رگرسیون استحکام ژل، اثر دما معنی‌دار نشده است.

آنالیز واریانس مدل‌های رگرسیون راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب پرتو در استخراج اسیدی نشان داد که مدل‌های فوق با ضرایب هم‌بستگی به ترتیب ۰/۹۹۸، ۰/۹۹۵ و ۰/۹۲۸ همگی معنی‌دار بوده و به خوبی با نتایج آزمایش‌ها، برازش داده شده‌اند.

آنالیز واریانس مدل‌های رگرسیون هم‌چنین نشان داد که در مدل رگرسیون راندمان جملات خطی معنی‌دار شده‌اند، در مدل‌های رگرسیون استحکام ژل و ویسکوزیته، جملات خطی، درجه دوم و حاصل ضرب‌ها معنی‌دار شده‌اند. در مدل رگرسیون جذب، جملات خطی و درجه دوم معنی‌دار شده‌اند. از اینرو می‌توان از مدل‌های رگرسیون مذکور به منظور پیشگویی (Prediction) مقادیر متغیرهای تابع در سطوح مختلف متغیرهای فرایند استخراج اسیدی، استفاده نمود.

### مدل رگرسیون راندمان

ضرایب هم‌بستگی پیرسون میان متغیرهای فرایند و متغیرهای تابع در جدول ۴ نشان می‌دهد که اثر متغیر pH بر روی افزایش راندمان ژلاتین در استخراج اسیدی بیش از دو متغیر دما و زمان می‌باشد.

(Response Surface Regression) آنالیز شده و هر یک از متغیرهای تابع (راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب در ۴۲۰ نانومتر) در قالب مدل رگرسیون درجه دوم زیر به صورت تابعی از متغیرهای مستقل فرایند اسیدی ( $X_1, X_2, X_3$ ) ارائه شدند:

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

Y نشان دهنده متغیر تابع یا پاسخ (Response Variable) است.  $\beta_{ij}$ ،  $\beta_{ii}$ ،  $\beta_i$ ،  $\beta_0$  ضرایب مدل رگرسیون بوده و  $x_i$  و  $x_j$  متغیرهای مستقل، به شکل کد بندی شده می‌باشند. کل مدل شامل جملات خطی درجه دوم و حاصل ضرب‌ها (Cross-Product) می‌باشد (۳):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای تابع در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل نمودارهای سطوح پاسخ و کانتور (Response Surface and Contour Plot) آنها به وسیله نرم افزار سورفر - ۷ (Surfer) ترسیم شدند. به منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش داده شده با داده‌های آزمایشی استخراج اسیدی، عمل استخراج اسیدی 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 اسیدی در شرایط بهینه تعیین شده، انجام گرفته و به منظور مقایسه ژلاتین حاصل با ژلاتین تجارتي خصوصیات آنها به طریق آماری با هم مقایسه شدند (خصوصیات تجارتي نیز اندازه‌گیری شد) (۳).

### نتایج و بحث

ترکیبات استخوان مورد استفاده در این تحقیق از نظر میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر به ترتیب  $23/50 \pm 1/25$ ،  $16/93 \pm 0/30$ ،  $25/54 \pm 0/27$  و  $34/03 \pm 1/43$  تعیین شد. این ترکیبات نشان دهنده خصوصیات ماده اولیه می‌باشد، مثلاً میزان پروتئین بر راندمان تولید ژل، میزان چربی بر نحوه آماده سازی اولیه استخوان و میزان خاکستر

جدول ۲. داده‌های آزمایشی استخراج اسیدی و نتایج راندمان، بلوم، ویسکوزیته و جذب ژلاتین حاصل

مشاهدات	pH <sub>X1</sub>	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	متغیرهای پاسخ <sup>(۱)</sup>		
				راندمان y <sub>1</sub> (%)	بلوم (گرم) y <sub>2</sub>	ویسکوزیته (سانتی‌پواز) y <sub>3</sub>
۱	۱	۱	۰	۱۲/۶۷	۱۱۸/۵	۴/۲
۲	۱	-۱	۰	۱۰/۱۸	۱۲۲/۸	۴/۳۸
۳	-۱	۱	۰	۱۹/۲۹	۲۰۶/۸	۳/۳۵
۴	-۱	-۱	۰	۱۸/۲۳	۱۸۷/۹	۲/۹۶
۵	۱	۰	۱	۱۲/۵۶	۱۰۳/۱	۴/۳۱
۶	۱	۰	-۱	۱۱/۲۳	۱۷۹/۵	۴/۲۴
۷	-۱	۰	۱	۱۹/۰۵	۱۹۷/۳	۳/۱۹
۸	-۱	۰	-۱	۱۷/۸۹	۲۵۴/۲	۳/۰۱
۹	۰	۱	۱	۱۸/۱۲	۱۲۱/۳	۳/۹۴
۱۰	۰	۱	-۱	۱۶/۲۵	۲۱۵/۳	۳/۹
۱۱	۰	-۱	-۱	۱۵/۸۶	۱۲۴/۸	۳/۷۸
۱۲	۰	-۱	-۱	۱۳/۲۲	۲۰۴/۷	۳/۶۷
۱۳	۰	۰	۰	۱۵/۱۱	۱۳۸/۸	۴/۱۸
۱۴	۰	۰	۰	۱۵/۲۸	۱۳۶/۴	۴/۱۹
۱۵	۰	۰	۰	۱۵/۱۹	۱۳۲/۷	۴/۱۸

1. Response Variables

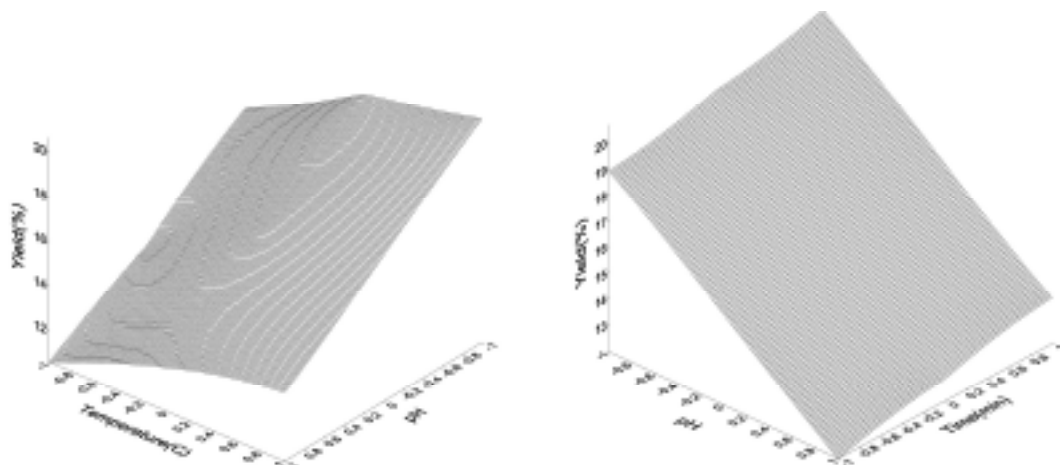
جدول ۳. ضرایب برآورد شده مدل‌های رگرسیون راندمان، بلوم، ویسکوزیته و جذب در استخراج اسیدی

ضریب	درجه آزادی	راندمان (درصد) y <sub>1</sub>	بلوم (گرم) y <sub>2</sub>	ویسکوزیته (سانتی‌پواز) y <sub>3</sub>	جذب در ۴۲۰ نانومتر y <sub>4</sub>
β <sub>0</sub>	۱	۱۵/۱۹۳**	۱۳۵/۹۷**	۴/۱۸۳**	۰/۰۶۶**
β <sub>1</sub>	۱	-۳/۴۷۷**	-۴۰/۲۸۷**	۰/۵۷۷۵**	-۰/۰۰۱۸۷۵
β <sub>2</sub>	۱	۱/۱۰۵**	۲/۷۱۲۵	۰/۰۷۵**	۰/۰۰۹۷۵**
β <sub>3</sub>	۱	۰/۸۷۵**	-۳۸/۴**	۰/۰۵*	۰/۰۰۸۳۷۵*
β <sub>11</sub>	۱	-۰/۳۹۰۴	۲۰/۰۱۷**	-۰/۲۹۸**	-۰/۰۱۲۶۲۵*
β <sub>21</sub>	۱	۰/۳۵۷۵	-۵/۸	-۰/۱۴۲۵**	۰
β <sub>22</sub>	۱	۰/۲۸۹۶	۳/۰۱۷	-۰/۱۶۲۹**	-۰/۰۰۸۸۷۵**
β <sub>31</sub>	۱	۰/۰۴۲۵	-۴/۸۷۵	-۰/۰۲۷۵	-۰/۰۰۰۶۷۵
β <sub>32</sub>	۱	-۰/۱۹۲۵	-۳/۵۲۵	-۰/۰۱۷۵	۰/۰۰۰۷۵
β <sub>33</sub>	۱	۰/۳۷۹۶	۲۷/۵۴۱۷**	-۰/۱۹۷۹**	-۰/۰۰۰۶۵۲۵

\* و \*\*: ضرایبی که در مدل رگرسیون معنی‌دار شده‌اند.

جدول ۴. ضرایب هم‌بستگی میان متغیرهای فرایند استخراج اسیدی و متغیرها

متغیر	ضریب هم‌بستگی		
	راندمان (درصد)	استحکام ژل (گرم)	ویسکوزیته (سانتی‌پواز)
pH	-۰/۹۱۳	-۰/۳۹۷	۰/۳۷۵
دما	۰/۲۹	۰/۳۴۲	۰/۵۱۷
زمان	۰/۲۳	-۰/۷۴۶	-۰/۷۳۶



شکل ۱. نمودار سطح پاسخ راندمان استخراج اسیدی در مقابل pH، دما و زمان فرایند

می‌دهد که اثر دو متغیر pH و زمان استخراج اسیدی معنی‌دار است. به دلیل هم‌بستگی منفی متغیر زمان با مقدار استحکام ژل در استخراج اسیدی، با افزایش زمان، مقدار مقاومت ژل با سرعت بیشتری کاهش می‌یابد (شکل ۲). در حالی که با کاهش pH، افزایش زمان فرایند استخراج اسیدی سبب افزایش استحکام ژل حاصل می‌شود. روند تغییر استحکام ژل با pH و دما در شکل ۲ به صورت سطح پاسخ نشان داده شده است. با کاهش pH، به دلیل افزایش مقدار ملکول‌های ژلاتین به فرم آلفا، (در هنگام استخراج ژلاتین بر اثر افزایش دما، کلاژن می‌تواند به سه نوع زنجیره به نام‌های آلفا، بتا و گاما تبدیل شود) مقدار استحکام ژل حاصل افزایش پیدا می‌کند (۸).

#### مدل رگرسیون ویسکوزیته

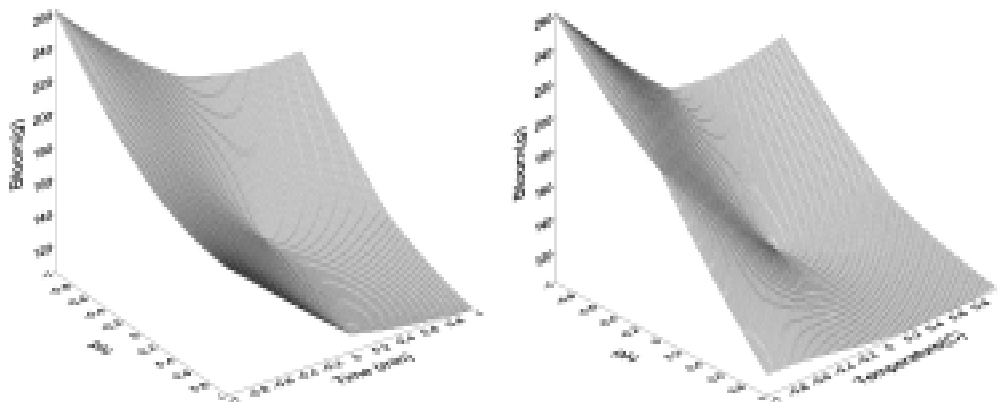
نتایج آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر روی ویسکوزیته نشان داد که اثر هر سه متغیر pH، دما و زمان در

هم‌چنین از بین دو متغیر دما و زمان نیز، متغیر دما دارای تأثیر بیشتری بر روی افزایش راندمان در طول استخراج اسیدی ژلاتین، می‌باشد. روند تغییرات راندمان با pH، دما و زمان در شکل ۱ به صورت نمودار سطح پاسخ (Response surface) نمایش داده شده‌اند. خطی بودن مدل رگرسیون راندمان در این نمودارها مشهود است. روند تغییرات راندمان در نمودارهای سطح پاسخ شکل ۱ نشان می‌دهد که در pHهای بالا (۲/۶)، تأثیر دما و زمان فرایند استخراج اسیدی بر روی راندمان استخراج ژلاتین کم است، اما با کاهش pH، تأثیر دو فاکتور مذکور بر روی افزایش راندمان، افزایش می‌یابد. دلیل افزایش راندمان استحصال ژلاتین در نتیجه کاهش pH، افزایش میزان هیدرولیز پیوندهای بین زنجیره‌های کلاژن می‌باشد (۲۲).

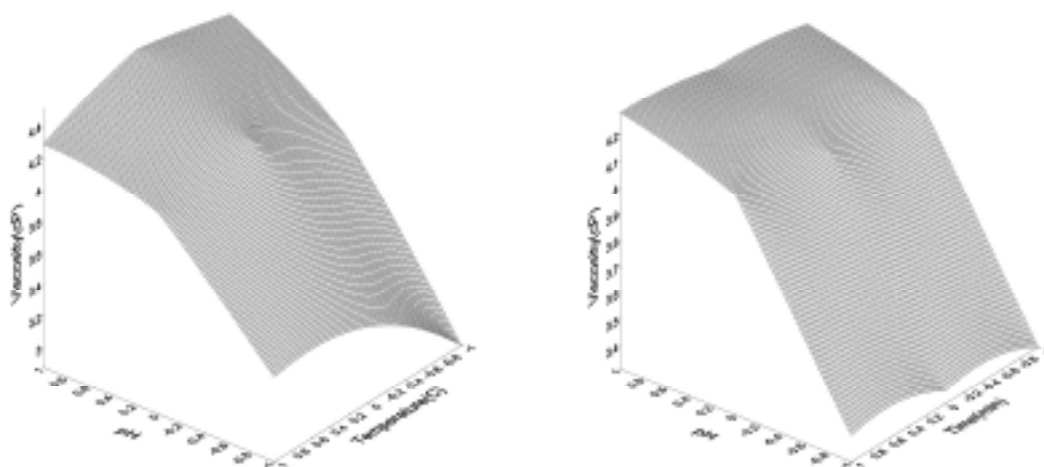
#### مدل رگرسیون استحکام ژل

آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر روی استحکام ژل نشان





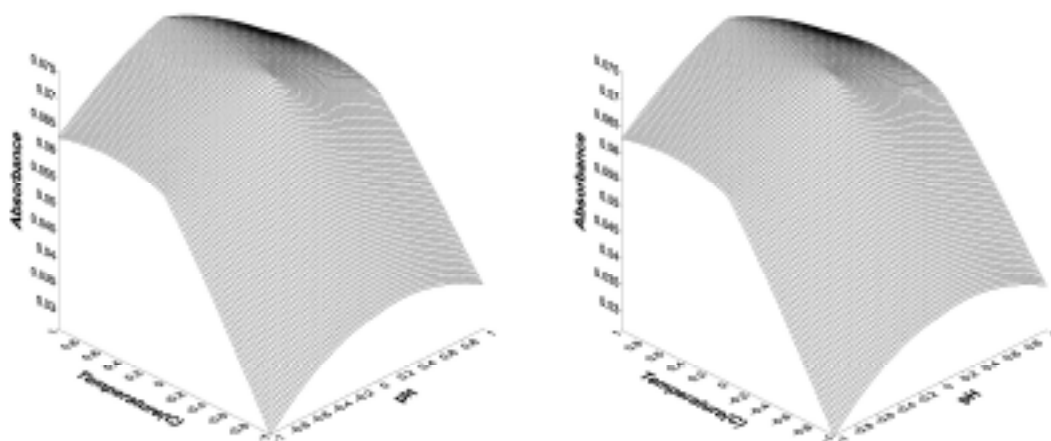
شکل ۲. نمودار سطح پاسخ استحکام ژل استخراج اسیدی در مقابل pH، دما و زمان فرایند



شکل ۳. نمودار سطح پاسخ ویسکوزیته استخراج اسیدی در مقابل pH، زمان و دمای فرایند

مدل رگرسیون جذب پرتو در طول موج ۴۲۰ نانومتر نتایج آنالیز اثر کلی متغیرهای فرایند بر مقدار جذب پرتو نشان داد که تنها اثر دو متغیر دما و زمان، در مدل معنی دار شده‌اند و متغیر pH معنی دار نشده است. ضریب هم‌بستگی متغیرهای فرایند و مقدار جذب محلول ژلاتین (جدول ۴) نشان می‌دهد که اثر دما بر روی افزایش میزان جذب پرتو بیش از اثر زمان بوده و اثر زمان نیز بیش از اثر pH می‌باشد. روند تغییرات میزان جذب پرتوی محلول ژلاتین در استخراج اسیدی در مقابل دما، زمان و pH در شکل ۴ مشخص شده است. تأثیر بیشتر دما و پس از آن زمان بر روی افزایش میزان جذب پرتو در این نمودارها مشهود است. نمودارهای سطح پاسخ جذب پرتو نشان می‌دهند که کمترین میزان جذب پرتو در کمترین مقدار دما و

مدل معنی دار است. ضرایب هم‌بستگی میان متغیرهای فرایند و متغیرهای تابع نشان می‌دهد که زمان استخراج، تأثیر بیشتری بر روی کاهش میزان ویسکوزیته ژلاتین استخراج اسیدی نسبت به دما و pH دارد. هم‌چنین اثر دما بر روی افزایش ویسکوزیته نیز کمتر از اثر pH است. روند تغییرات ویسکوزیته محلول ژلاتین استخراج اسیدی در مقابل pH، دما و زمان استخراج در شکل ۳ ارائه شده است. این نمودارها نشان می‌دهند که در pHهای پائین اثر دما و زمان استخراج تأثیر کمتری بر روی میزان ویسکوزیته محلول ژلاتین دارند، اما با افزایش pH، تأثیر دما و زمان نیز افزایش پیدا می‌کند. هم‌چنین با کاهش pH میزان ویسکوزیته کاهش می‌یابد که این به دلیل هیدرولیز بیشتر زنجیره‌های ژلاتین و در نتیجه کاهش میزان زنجیره‌های با وزن ملکولی بالا در ژلاتین می‌باشد (۸ و ۱۲).



شکل ۴. نمودار سطح پاسخ جذب پرتو در طول موج ۴۲۰ نانومتر، استخراج اسیدی در مقابل pH، دما و زمان فرایند

مقادیر متغیرهای فرایند در نقطه اپتیمم ترسیم برای هر یک از متغیرهای تابع در فرایند استخراج اسیدی عبارت‌اند از: راندمان :  $pH = 1/88$ ، دمای  $80^\circ$  درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۱۸ دقیقه  
 استحکام ژل :  $pH = 1/88$ ، دمای  $60^\circ$  درجه سانتی‌گراد، زمان ۴۸ دقیقه  
 ویسکوزیته :  $pH = 2/56$ ، دمای  $69^\circ$  درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۱۸ دقیقه  
 جذب پرتو :  $pH = 2/6$ ، دمای  $62^\circ$  درجه سانتی‌گراد، زمان ۴۸ دقیقه

ویسکوزیته و استحکام ژل تابع هدف هستند. خصوصیات عملکردی و ویژگی‌های ژلاتین اسیدی استخراج شده در بهترین شرایط، وقتی ویسکوزیته و استحکام ژل تابع هدف است در جدول ۶، با ژلاتین تجارتي مورد مقایسه قرار گرفته است. وقتی ویسکوزیته تابع هدف است، نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که بین ژلاتین اسیدی و تجارتي در سطح احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۷). در این حالت ژلاتین اسیدی بهترین ویسکوزیته را دارا بود، اما از نظر استحکام ژل، ژلاتین تجارتي دارای بلوم بیشتری بود. جذب پرتو هردونمونه ژلاتین در سطح احتمال ۹۵ درصد با هم اختلاف داشتند و ژلاتین اسیدی دارای بیشترین میزان جذب پرتو بود. pH ژلاتین‌های تجارتي و اسیدی در سطح احتمال ۹۵ درصد

زمان استخراج مشاهده می‌شود. به‌طور کلی افزایش جذب پرتو محلول ژلاتین با افزایش دما و زمان استخراج اسیدی می‌تواند بدلیل تولید طیفی از ملکول‌های ژلاتین با وزن ملکولی خاص باشد که این ملکول‌ها دارای میزان جذب پرتو بیشتری در محلول ژلاتین می‌باشند. از آنجایی که میزان جذب پرتو محلول ژلاتین نشان دهنده کیفیت رنگ ژلاتین است، بنابراین نقطه اپتیمم شرایط متغیرهای فرایند طوری انتخاب می‌شود که میزان جذب پرتو کمتری داشته باشد (۱۲).

#### تعیین نقطه اپتیمم استخراج اسیدی

مدل‌های رگرسیون حاصل از داده‌های آزمایش برای متغیرهای تابع (راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب)، بسته به نوع و درجه مدل دارای نقاط سکون (Stationary Point) می‌باشند (۱). این نقاط می‌توانند ماکزیمم، مینیمم، نقطه عطف، نقطه زینی (Saddle Point) و ... باشند (۱). سطوح پیشگویی شده متغیرهای فرایند استخراج اسیدی برای نقاط سکون مدل‌های رگرسیون راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب در جدول ۵ ارائه شده‌اند. اما با توجه به مقادیر مطلوب راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب از روی انطباق نمودارهای کانطور همه متغیرهای تابع، می‌توان نقطه اپتیمم را به صورت ترسیمی برآورد نمود.

جدول ۵. سطوح پیشگویی شده متغیرهای فرایند استخراج اسیدی، برای مقادیر اپتیمم راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب پرتو

سطوح متغیرهای فرایند برای مقادیر اپتیمم				متغیرهای فرایند
راندمان (%)	استحکام ژل (گرم)	ویسکوزیته (سانتی پواز)	جذب در ۴۲۰ نانومتر	
-۴/۲۸۱	۱/۳۰۸۹	۱/۰۱۸		pH (x <sub>1</sub> )
۰/۴۷۱	۱/۳۳۳۵	-۰/۲۱۹	۱/۴۲۴۲	دما (x <sub>2</sub> )
-۰/۷۳۹	۰/۸۹۸۳	۰/۰۶۵	۲/۰۷۰۶	زمان (x <sub>3</sub> )
نقطه زینی	مینیمم	ماکزیمم	ماکزیمم	مورفولوژی*

\*: مشخصات فنی (۱)

جدول ۶. مقایسه خصوصیات عملکردی ژلاتین اسیدی و تجارتي (ویسکوزیته و استحکام ژل تابع هدف است)

ویسکوزیته تابع هدف		استحکام تابع هدف		خصوصیات
روش اسیدی	تجارتی	روش اسیدی	تجارتی	
۴/۴۹	۴/۱۳	۲/۹۶	۴/۱۳	ویسکوزیته (سانتی پواز)
۱۰۷/۸۴	۲۰۵/۶۳	۲۶۲/۲	۲۰۵/۶۳	استحکام ژل (گرم)
۰/۰۶۴	۰/۰۴۵	۰/۰۲۸	۰/۰۴۵	جذب پرتو در طول موج ۴۲۰ نانومتر
۵/۴۳	۵/۴۴	۵/۴۲	۵/۴۴	pH
۱/۷۵	۱/۵۰	۱/۷۳	۱/۵۰	خاکستر (درصد)
۲۸/۴	۳۱/۰	۳۱/۳	۳۱/۰	نقطه ذوب (درجه سانتیگراد)

جدول ۷. مقایسه میانگین خصوصیات ژلاتین های اسیدی و تجارتي

ویسکوزیته تابع هدف		استحکام تابع هدف		خصوصیات
روش اسیدی	تجارتی	روش اسیدی	تجارتی	
۴/۴۹ <sup>a</sup>	۴/۱۳ <sup>b</sup>	۲/۹۶ <sup>b</sup>	۴/۱۳ <sup>a</sup>	ویسکوزیته (سانتی پواز)
۲۰۵/۶۳ <sup>a</sup>	۱۰۷/۸۴ <sup>b</sup>	۲۶۱/۸۵ <sup>a</sup>	۲۰۵/۶۳ <sup>b</sup>	استحکام (گرم)
۰/۰۶۴ <sup>a</sup>	۰/۰۴۵ <sup>b</sup>	۰/۰۲۸ <sup>a</sup>	۰/۰۴۵ <sup>b</sup>	جذب پرتو در طول موج ۴۲۰ نانومتر
۵/۴۵ <sup>a</sup>	۵/۴۲ <sup>a</sup>	۵/۴۵ <sup>a</sup>	۵/۵۵ <sup>a</sup>	pH
۱/۵ <sup>a</sup>	۱/۷۵ <sup>b</sup>	۱/۷۳ <sup>b</sup>	۱/۵ <sup>a</sup>	خاکستر (درصد)
۲۸/۴ <sup>a</sup>	۳۱/۰ <sup>b</sup>	۳۱/۳ <sup>b</sup>	۳۰/۹۷ <sup>a</sup>	نقطه ذوب (درجه سانتیگراد)

اختلاف معنی داری نداشتند. میزان خاکستر ژلاتین تجارتي با ژلاتین اسیدی در سطح احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی داری داشت، که این مسئله به دلیل تفاوت روش خالص سازی در دو نمونه ژلاتین اسیدی و تجارتي می باشد. در مجموع میزان خاکستر هر دو نمونه کمتر از حد قابل قبول برای ژلاتین های غذایی می باشد (۱۳ و ۱۴).

هنگامی که استحکام ژل تابع هدف بود، نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که بین هر دو نمونه ژلاتین در سطح احتمال

اختلاف معنی داری نداشتند. میزان خاکستر ژلاتین تجارتي با ژلاتین اسیدی در سطح احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی داری داشت، که این مسئله به دلیل تفاوت روش خالص سازی در دو نمونه ژلاتین اسیدی و تجارتي می باشد. در مجموع میزان

جدول ۸. ترکیب آمینو اسیدی ژلاتین اسیدی و ژلاتین تجارتي (گرم در صد گرم ژلاتین)

درصد		اسید آمینه	درصد		اسید آمینه
ژلاتین تجارتي	ژلاتین اسیدی		ژلاتین تجارتي	ژلاتین اسیدی	
۱۲/۸۹	۱۲/۸۸	پرولین	۲۴/۶۱	۲۴/۵۲	گلايسين
۰/۶۹	۰/۶۲	میتونین	۵/۹۹	۶/۸۳	آلانین
۴/۰۹	۴/۷۷	لایزین	۲/۱۸	۲/۳۳	والین
۲/۵۳	۲/۵۲	ترئونین	۲/۸۳	۲/۸۸	سرین
۲/۶۱	۱/۴۸	آسپارتیک اسید	۰/۷۴	۰/۸۳	تیروزین
۸/۲۴	۴/۸۸	گلوتامیک اسید	۱/۳۶	۱/۲۸	ایزولوسین
۶/۳۳	۵/۷	آرژنین	۲/۲۸	۱/۲۷	لوسین
۲/۳۳	۳/۱	هیستیدین	۲/۱۱	۲/۲۳	فنیل آلانین

استخراج شده در این تحقیق و نیز ژلاتین تجارتي به لحاظ مقدار آهن و مس وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن نشان داد که بین نمونه ژلاتین اسیدی و ژلاتین تجارتي اختلاف معنی داری به لحاظ مقدار آهن و مس وجود دارد. ژلاتین تجارتي موجود در بازار به دلیل استفاده از روش‌های خالص سازی تکمیلی با گذراندن محلول ژلاتین از میکروفیلترها و فیلترهای پرس دارای خلوص بیشتری بوده‌اند.

با توجه به حدود مجاز مقدار خاکستر، آهن، مس، سرب در ژلاتین خوراکی مشاهده می‌شود که مقدار عناصر مذکور در نمونه‌های استخراجی در این تحقیق و نیز ژلاتین تجارتي از حد مجاز کمتر می‌باشند، بنابراین این مقادیر قابل قبول می‌باشند (حد مجاز به طور کلی برای فلزات سنگین کمتر از ۵۰ پی پی ام، برای سرب ۱۵ پی پی ام، برای مس کمتر از ۳۰ پی پی ام و برای آهن کمتر از ۳۰ پی پی ام می‌باشد) (۱۳ و ۱۴).

ترکیب آمینواسیدی ژلاتین - نتایج آنالیز آمینو اسیدی ژلاتین استخراج شده به روش اسیدی و نمونه ژلاتین تجارتي در جدول ۸ ارائه شده است.

همان‌گونه که مشاهده می‌شود ترکیب آمینواسیدی دو ژلاتین فوق شبیه به هم می‌باشند. مقدار اسیدهای آمینه اصلی موجود در ژلاتین استخراج شده در این تحقیق و ژلاتین تجارتي نظیر گلايسين، پرولین و آلانین بسیار به هم نزدیک می‌باشد. اما

۹۵ درصد اختلاف معنی داری وجود دارد (جدول ۷). در این حالت ژلاتین اسیدی بهترین استحکام ژل را دارا می‌باشد، اما از نظر ویسکوزیته، ژلاتین تجارتي دارای ویسکوزیته بیشتری است. جذب هر دو نمونه ژلاتین در سطح احتمال ۹۵ درصد باهم اختلاف دارند و ژلاتین اسیدی دارای کمترین میزان جذب پرتو می‌باشد. pH ژلاتین تجارتي و اسیدی در سطح احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی داری دارد. میزان خاکستر ژلاتین تجارتي با ژلاتین اسیدی در سطح احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی داری داشت، این مسأله به دلیل تفاوت روش خالص سازی در دو نمونه ژلاتین اسیدی و تجارتي می‌باشد. در مجموع میزان خاکستر هر دو نمونه کمتر از حد قابل قبول برای ژلاتین‌های غذایی می‌باشد (۲ و ۵).

#### مقایسه مقدار آهن، مس و سرب

همچنین نتایج اندازه‌گیری آهن و مس موجود در نمونه‌های ژلاتین استخراج شده در این تحقیق (۲۱/۱۷ و ۷/۱۱ پی پی ام) و ژلاتین تجارتي به عنوان نمونه شاهد (۱۷/۶۶ و ۶/۲۵ پی پی ام) به وسیله اسپکتروفتومتر جذب اتمی تعیین شد. میزان سرب در هر دو ژلاتین کمتر از حد حساسیت دستگاه (۱/۰۵ پی پی ام) بود. نتایج آنالیز واریانس اندازه‌گیری‌های فوق در سطح احتمال ۹۹ درصد نشان داد که اختلاف معنی داری بین نمونه‌های ژلاتین

اسیدی نشان دادند که مدل‌ها بخوبی با داده‌های آزمایشی برازش داده شده اند. هم‌چنین نتایج انجام آزمایش به‌منظور تأیید مدل، صحت مدل‌ها را تأیید نمود. مقایسه ژلاتین حاصل از روش استخراج اسیدی با ژلاتین تجارتي نشان داد که وقتی استحکام ژل تابع هدف است، ژلاتین اسیدی تولید شده در این تحقیق دارای بیشترین بلوم می‌باشد. بنابراین چنانچه استحکام ژل هدف باشد، طبق یافته‌های این تحقیق پیشنهاد می‌شود از روش اسیدی استفاده شود.

مقدار اسید آمینه‌های آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید در نمونه استخراجی کمتر از ژلاتین تجارتي می‌باشد. این پدیده احتمالاً به دلیل هیدرولیز بیشتر گروه‌های آمیدی در ژلاتین استخراجی می‌باشد (۸).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که می‌توان فرایند استخراج اسیدی را با روش رگرسیون سطوح پاسخ (RSREG) مدل سازی نمود. ضرایب هم‌بستگی مدل‌های رگرسیون برازش داده شده راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب در فرایند

### منابع مورد استفاده

۱. بدیعی، م. ۱۳۷۸. کتاب جیبی ریاضیات برای مهندسان. نشر انگیزه، تهران.
۲. حسینی، ز. ۱۳۷۳. روش‌های متداول در تجزیه ی مواد غذایی. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه شیراز.
۳. رضایی، ع. م. ا. سلطانی. ۱۳۷۷. مقدمه‌ای بر تحلیل رگرسیون کاربردی. مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان.
4. Bogue, R. H. 1923. Conditions affecting the hydrolysis of collagen to gelatin. *Indus. and Eng. Chem.* 15 (11): 1154-1159.
5. Choi, S. S. and J. M. Regenstien. 2000. Physicochemical and Sensory Characteristics of Fish Gelatin. *J. Food Sci.* 65 (2): 194-199.
6. Cochran W. G. and G. M. Cox. 1957. *Experimental Designs*. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons. Inc., New York.
7. Floros, J. D. and M. S. Chinnan. 1988. Computer graphics-assisted optimization for product and process development. *Food Technol.* 42 (2): 72-78.
8. Francis, F. J. 2000. *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
9. Grossman, Sh., Gan, R. and M. Bergman. 1992. Process for the production of gelatin from fish skins. US Patent, PN. 5,093,474.
10. Helrich, K. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists*, fifth edition, Published by Association of Official Analysis Chemists Inc., Virginia, USA.
11. Holzer, D. 1996. Gelatin production. US Patent, PN. 5,484,888.
12. Hu, R. 1999. *Food Product Design*, Technomic Publishing Company Inc., USA.
13. Imeson, A. 1997. *Thickening and Jelling agents for Food*. second edition, Chapman & Hall, UK.
14. Internet at :<http://www.gelatin-gmia.com/> Browsed at 10,2002
15. Internet at :<http://www.aaachem.com/> Browsed at 12,2002
16. Jones, R. T. 1970. Pharmaceutical Gelatin- Manufacture. *Process Biochem.* 5: 17-23.
17. 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.
18. Nasrallah, M. and P. Ghossi. 1993. Extraction process for gelatin. US Patent, PN. 5, 210, 182.
19. 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. *Chem. Eng. J.* 67: 55-64.
20. Petersen, B. R. and J. R. Yates. 1977. Gelatin extraction. US Patent, PN. 4,064,008.
21. Rowlands, A. G. and D. J. Burrows. 2000. Enzyme method of manufacturing gelatin. US patent, PN. 6, 100, 381.
22. Shreve, R. N. and J. A. Brink. 1977. *Chemical Process Industries*. Forth edition, McGraw-Hill , New York.