

۲۱ الی ۲۳ شهریور ۸۵

مدلینگ سطح پاسخ (RSM) و بهینه سازی استخراج آنزیمی ژلاتین خوراکی از استخوان

سید هاشم حسینی پرور^{۱*}، جواد کرامت^۲، مهدی کدیور^۲

چکیده :

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

کلید واژه : ژلاتین، استخراج آنزیمی، مدلینگ سطح پاسخ (RSM)، بهینه سازی

1 - دانشجوی دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد- عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه مازندران

Email:hosseiniaparvar@yahoo.com

2 - استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی- دانشگاه صنعتی اصفهان

ژلاتین عبارتست از يك پلی پپتید با وزن ملکولی بالا که از کلاژن بافت‌های پیوندی، پوست، استخوان و تاندونها مشتق می‌شود [۷ و ۱۴]. ژلاتین با آب تشکیل ژل می‌دهد که تحت تاثیر حرارت برگشت‌پذیر^۱ می‌باشد. نقطه ذوب ژل (کمتر از ۳۵ °C) پائین‌تر از دمای بدن انسان می‌باشد که این ویژگی به محصولات ژلاتین خصوصیات طعمی و ارگانولپتیکی منحصر به فردی داده است [۱۴]. بسته به نوع فرآیند دونه‌های ژلاتین وجود دارد: ژلاتین نوع **A** توسط فرآیند اسیدی و ژلاتین نوع **B** توسط فرآیند قلیایی تولید می‌شود [۷، ۴ و ۱۴].

ترکیب آمینواسیدی ژلاتین را به شکل **glycine - X - Y** نشان می‌دهند که **X** و **Y** می‌توانند هر یک از اسیدهای آمینه باشند اما پرولین برای موقعیت **X** و هایدروکسی پرولین برای موقعیت **Y** دارای برتری می‌باشند [۱۳].

نقطه ایزوالکتریک ژلاتین می‌تواند بین ۹/۴ (بدون تغییر گروه‌های آمیدی) و ۴/۸ (در صورتی که ۹۰ تا ۹۵ درصد گروه‌های کربوکسیلیک اسید بصورت آزاد باشند) باشد [۷].

ژلاتین محصول دناتوره شدن یا تجزیه^۲ کلاژن است [۱۴]. در طی این تبدیل، فیبرهای کلاژن که در آب نامحلول هستند، دپلیمریزه‌تر شده و به ژلاتین محلول در آب تبدیل می‌شود. تبدیل کلاژن به ژلاتین مستلزم هیدرولیز اسیدی یا قلیایی کلاژن می‌باشد. هیدرولیز آنزیمی نیز برای تولید ژلاتین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار می‌گیرد [۷]. از جمله خصوصیات عملکردی ژلاتین^۳ می‌توان به: حلالیت در آب، چسبندگی^۴، تشکیل ژل، تشکیل کف، تشکیل فیلم^۵، امولسیون‌کنندگی، پایدارکنندگی اشاره کرد [۷ و ۱۴].

هنگامی که مقاومت ژل به روش استاندارد محاسبه می‌شود به آن **Bloom Strength** می‌گویند [۱۴]. برای تعیین مقاومت ژل روشی استاندارد با استفاده از دستگاه بلوم ژلومتر توسط انستیتو استاندارد های بریتانیا ارائه شده است (BS 757, 1975)، براین اساس مقدار مقاومت ژل را بر حسب گرم با بلوم^۱ نشان می‌دهند. بلوم ژلاتین‌های تجارتي بین ۵۰ تا ۳۰۰ در غلظت ۶/۶۷ درصد می‌باشد که این مقادیر با افزایش زمان رسیدن ژل افزایش یافته و نیز با افزایش دما کاهش می‌یابد [۷]. ویسکوزیته ژلاتین عمدتاً از روی زمان جریان یافتن محلول ژلاتین از پیپت کالیبره شده ویسکوزیته محاسبه می‌شود که معمولاً بین ۱/۵ تا ۷/۵ mPa.s تغییر می‌کند.

تفاوت روش‌های تولید ژلاتین بستگی به روش بکار گرفته شده بر روی مواد خام اولیه دارد. بر حسب اینکه از چه پیش‌تیماری استفاده گردد، چهار روش برای تولید ژلاتین وجود دارد که عبارتند از: روش اسیدی، روش قلیایی، روش پراکسید هیدروژن و روش آنزیمی. مواد اولیه خامی که ژلاتین از آنها استخراج می‌شود عبارتند از: استخوان دمینراله (اوسئین)، پوست خوک، پوست گاو و پوست ماهی. مطلوبترین ماده اولیه حاوی کلاژن برای تولید ژلاتین باکیفیت بالا، استخوان گاو است [۱۰]. پیش از انجام پیش‌تیمار و در ادامه تولید ژلاتین، معمولاً بر روی مواد خام حاوی کلاژن

1 - Thermally Reversible

2 - Disintegration

3 - Gelatin functional properties

4 - Adhesiveness

5 - Film forming

6 - Bloom gelometer

بسته به نوع آنها، یکسری اعمال صورت می‌گیرد که عبارتند از : درجه بندی، چربی‌گیری، کاهش اندازه و دمی‌نراله کردن. روش‌های خالص‌سازی ژلاتین استخراج شده بسته به اینکه تا چه سطحی انجام شود متفاوت است. محلول ژلاتین می‌تواند از طریق فلوکوله کردن، که طی آن پروتئین‌های غیرژلاتینی و لیپیدها حذف می‌شوند، شفاف‌سازی گردد [۱۰]. برای تصفیه بیشتر می‌توان از فیلتراسیون ریز^۱ و یا ستون‌های تعویض یونی کاتیونی و آنیونی و نیز فرآیند های میکروفیلتراسیون استفاده کرد [۴]. به منظور بوگیری^۲ محلول ژلاتین معمولاً از کربن اکتیو به میزان ۰/۳ گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خام استفاده می‌شود و سپس فیلتراسیون مجدد صورت می‌گیرد [۷]. پس از خالص‌سازی محلول ژلاتین آنر^۳ خلاء و در دماهای پایین تغلیظ کرده و خشک می‌کنند، آنگاه ژلاتین شده را آسیاب کرده و پس از بسته بندی به بازار عرضه می‌کنند [۴]

۲- مواد و روش‌ها

استخوان گاو مورد استفاده در این تحقیق از شرکت فرآورده‌های گوشتی صنوبر، ژلاتین تجارتي از شرکت بیگروفا^۴ و آنزیم پروتئاز نووتراز از شرکت نووو^۵ تهیه شدند. کلیه مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان. تجهیزات مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: آسیاب چکشی، دستگاه اندازه‌گیری خصوصیات بافت، مدل ۱۱۴۰، ساخت شرکت اینستران^۶ انگلستان، آون معمولی، ساخت شرکت هراوس^۶ آلمان، ترازوی آزمایشگاهی با دقت ± 0.0001 ساخت شرکت شیمادزو^۷ ژاپن، دستگاه ویسکوزیتر بروکفیلد^۸ ساخت آمریکا، هات پلیت مجهز به همزن مغناطیسی ساخت شرکت روهرو آلمان، دستگاه اندازه‌گیری پروتئین میکروکلدال ساخت شرکت بوخی^۹ سوئد (شامل بخش‌های هضم و تقطیر)، دستگاه pH متر مدل ۷، ساخت شرکت کورنینگ ایل انگلستان^{۱۰}، دستگاه اسپکتروفتومتر کم اسپک^{۱۱} مدل ۳۵۰ (دوپرتویی، UV- مرئی ساخت انگلستان)، دستگاه تبخیر کننده چرخان ساخت شرکت هیدولف^{۱۲} آلمان، دستگاه سانتریفوژ سیگما مدل ۳ ای-۱^{۱۳} ساخت آلمان، رفاکتومتر رومیزی آبه^{۱۴} مدل کارلزایس^{۱۵}، پمپ خلأ مسترکول ساخت امریکادستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی پرکین - المر^{۱۶}، مدل ۲۳۸۰ ساخت امریکا.

۲-۱ - روشها

مراحل عملی این پژوهش در چند بخش انجام شد که عبارتند از: آماده‌سازی نمونه‌های آزمایشی، آنالیز ترکیبات استخوان، انجام مراحل استخراج آنزیمی، خالص‌سازی محلول‌های ژلاتین حاصل و سپس تعیین راندمان استخراج، بلوم، ویسکوزیته و جذب نمونه‌ها و نهایتاً مدلینگ استخراج

-
- 1 - Fine Filtration
 - 2 - Deodorization
 - 3 - Begerov
 - 4 - Novo
 - 5 - Instron
 - 6 - Heroeus
 - 7 - Shimadzu
 - 8 - Brookfield
 - 9 - Buchi
 - 10 - CORNING-EEL
 - 11 - Camspec
 - 12 - Heidolph
 - 13 - Sigma 3E-1
 - 14 - Abbe
 - 15 - Carlzeiss
 - 16 - Perkin Elmer

آنزیمی ژلاتین و پیشگویی شرایط استخراج بهترین نمونه ژلاتین به لحاظ راندمان و خصوصیات عملکردی (بلوم، ویسکوزیته و رنگ) با استفاده از مدل.

۲-۱-۱-۲- آماده سازی نمونه ها

مقدار ۳۰ کیلوگرم از استخوان های تهیه شده، ابتدا توسط ساتور به قطعات چند سانتیمتری خرد شده، سپس استخوان های خرد شده به وسیله دستگاه آسیاب چکشی به ذرات ۱-۳ میلی متر تبدیل شدند. پس از مخلوط کردن استخوان های خرد شده (به منظور همگن نمودن آنها) نمونه های آزمایشی ۲۰۰ گرمی استخوان، در نایلون های پلاستیکی بسته بندی شده و در سردخانه زیر صفر نگهداری شدند، تا به مرور از این نمونه ها در آزمایشها استفاده شود [۱۳].

۲-۱-۲- آنالیز ترکیبات استخوان

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

۲-۱-۳- چربی گیری استخوان

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

۲-۱-۴- دمینراله کردن استخوان

دمینراله کردن استخوان به منظور خارج کردن مواد معدنی موجود در آن انجام گرفت. روش کار بدین صورت بود که به نمونه استخوان چربی گیری شده (حدود ۲۰۰ گرم)، مقدار ۱۴۲۸ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک با غلظت ۵۰ گرم در لیتر اضافه شد، مخلوط حاصل به مدت دو ساعت در دمای ۸ درجه سانتیگراد هم زده شد. پس از پایان زمان دمینراله کردن، فاز محلول روی مخلوط جدا شده و اوسئین حاصل (فاز جامد) به مدت ۷ دقیقه با ۶/۲ لیتر آب مقطر شستشو گردید. استخوان دمینراله برای استخراج به روش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت [۹].

۲-۱-۵- استخراج به روش آنزیمی

در این روش از آنزیم نوتراز^۱، که یک پروتئاز قلیایی است استفاده شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا pH اوسئین حاصل از مرحله دمینراله کردن با افزودن محلول هیدروکسید کلسیم در pH = ۹ تنظیم شد، سپس به میزان دو برابر وزن استخوان نمونه، محلول آنزیم نوتراز

با غلظت‌های ۲، ۶ و ۱۰ پی پی ام به اوسئین افزوده شد، آنگاه مخلوط حاصل در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸، ۱۲ و ۱۶ ساعت تیمار گردید. (لازم به ذکر است که $pH = 9$ و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم نوتراز می‌باشند). دمای مخلوط مذکور توسط هات پلیت مجهز به هم زن مغناطیسی در ۵۰ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شده و به طور مرتب هم زده می‌شد. pH نیز توسط محلول هیدروکسید کلسیم ثابت نگه داشته شد. پس از پایان تیمار آنزیمی، مخلوط مذکور به منظور غیرفعال کردن آنزیم به مدت ۱ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. سپس pH معادل ۷ تنظیم شده و عمل استخراج در دماهای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت انجام شد. پس از پایان استخراج، محلول ژلاتین توسط صافی و قیف بوختر صاف گردید و پس از طی مراحل خالص‌سازی مورد ارزیابی کمی و کیفی قرار گرفت [۱۲ و ۱۳].

متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی و سطوح آنها در طرح قابل چرخش مرکب مرکزی به صورت کدبندی شده در جدول ۲-۲ ارائه شده اند.

۲-۱-۶ - خالص‌سازی محلول ژلاتین

به محلول‌های ژلاتین حاصل از هر دو روش اسیدی و آنزیمی، تا رسیدن به $pH = 9$ ، محلول هیدروکسید کلسیم با درجه بومه ۶ افزوده شد. سپس با افزودن محلول سولفات آلومینیم ۲۵ درصد، pH محلول به ۷/۵ رسانده شد، آنگاه تا رسیدن به $pH = 5/5$ ، اسید فسفریک ۱۰ درصد اضافه شد.

جدول ۲-۲ - متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی و سطوح آنها در طرح قابل چرخش مرکب مرکزی

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

در این حالت ذرات ناخالصی در محلول ژلاتین ناپایدار شده و با سانتریفوژ کردن در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و سپس گذراندن از دو مرحله کاغذ صافی در قیف بوختر جدا شدند. به محلول ژلاتین حاصل، به منظور بوگیری ۰/۶ گرم کربن اکتیو اضافه شده و به خوبی مخلوط گردید. سپس با سه مرحله گذراندن از کاغذ صافی در قیف بوختر صاف گردید. محلول ژلاتین صاف شده به منظور جداسازی مواد معدنی باقی‌مانده در آن از ستون رزین تعویض یونی کاتیونی (پورولیت سی ۱۰۰) عبور داده شد. محلول ژلاتین شفاف حاصل به منظور انجام آزمایش‌های کمی و کیفی مورد استفاده قرار گرفت [۱۲، ۵ و ۱۳].

۲-۱-۷ - ارزیابی کمی و کیفی ژلاتین

الف- تعیین راندمان استخراج

به منظور تعیین راندمان استخراج هر یک از تیمارهای استخراج به روش اسیدی و آنزیمی، از رابطه اندیس رفراکتومتری و غلظت استفاده شد. به این صورت که بریکس محلول ژلاتین خالص‌سازی شده به وسیله رفراکتومتر

رومیزی آبه قرائت گردید، سپس با قرار دادن عدد بریکس در رابطه زیر غلظت ژلاتین در محلول محاسبه و در ۱۰۰ گرم استخوان گزارش شد [۱۱]:

$$\text{بریکس} \times ۶/۸۱ = \text{غلظت ژلاتین (گرم در لیتر)}$$

ب- تعیین استحکام ژل

اندازه‌گیری استحکام ژل حاصل از ژلاتین به روش استاندارد با استفاده از 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 در حمام آب داغ قرار داده شد، محلول ژلاتین به طور کامل همزده شده و به مدت ۱۷ ساعت در دمای $۱۰ \pm ۰/۱$ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از سپری شدن زمان رسیدگی ژل، استحکام ژل با استفاده از پلانجر با قطر ۱۲/۷ میلی‌متر و نفوذ ۴ میلی‌متر پلانجر به درون ژل، مقدار بلوم بر حسب گرم اندازه‌گیری شد [۲].

ج- اندازه‌گیری ویسکوزیته

اندازه‌گیری ویسکوزیته ژلاتین نیز به روش استاندارد و با استفاده از دستگاه ویسکومتر بروکفیلد انجام شد. ابتدا یک محلول ۶/۶۷ درصد ژلاتین تهیه گردید و در یک بشر ۶۰۰ میلی‌لیتری، توسط اسپیندل^۱ شماره ۱ ویسکومتر، با میزان ۶۰ دور در دقیقه^۲ مقدار ویسکوزیته محلول ژلاتین بر حسب واحد سانتی‌پوآز^۳ اندازه‌گیری شد [۳و۲].

د- 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^۴ اندازه‌گیری و گزارش شد [۱۳].

۲-۱-۸- طرح آزمایشی و روش آنالیز نتایج

در این پژوهش بمنظور بهینه سازی فرآیند استخراج ابتدا از روش تک فاکتوره مرسوم استفاده شد، اما به دلیل محدودیت های زمانی و مالی و نیز برتری های بهینه سازی با استفاده از روش مدل سازی، از روش مذکور استفاده شد. آزمایشهای استخراج آنزیمی به روش کاملاً تصادفی در قالب طرح قابل چرخش مرکب مرکزی با سه تکرار در نقطه مرکزی برای ۳ متغیر و در ۳ سطح انجام شدند. نتایج پژوهش با استفاده از نرم افزار آماری SAS به روش رگرسیون سطوح پاسخ^۵ آنالیز شده و هر یک از متغیرهای تابع (راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب در ۴۲۰ نانومتر) در قالب مدل رگرسیون درجه دوم زیر بصورت تابعی از متغیر های مستقل فرآیند اسیدی (X1,X2,X3) ارائه شدند:

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

که Y نشان دهنده متغیر تابع یا پاسخ^۶ است. β_0 ، β_i ، β_{ii} ، β_{ij} ضرایب مدل رگرسیون بوده و x_i و x_j متغیر های مستقل به شکل کد بندی شده می باشند. کل مدل شامل جملات خطی درجه دوم و حاصل ضرب ها^۷ می باشد [۱]:

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

1 - Spindle

2 - RPM

3 - cP

4 - Double-beam

5 - Response Surface Regression

6 - Response Variable

7 - Cross- Product

برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای تابع در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل نمودارهای سطوح پاسخ و کانتور آنها بوسیله نرم افزار سورفر- ۲۷ ترسیم شدند. به منظور ارزیابی صحت مدل های برازش داده شده با داده های آزمایشی استخراج آنزیمی، عمل استخراج آنزیمی در شرایط بهینه تعیین شده صورت گرفته و نتایج ارزیابی کمی و کیفی آن با مقادیر پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید. همچنین به دلیل اهمیت بیشتر دو فاکتور استحکام ژل و ویسکوزیته در ارزیابی ژلاتین، عمل استخراج ژلاتین به روش آنزیمی در شرایط بهینه تعیین شده انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تجزیه ترکیبات استخوان

ترکیب استخوان مورد استفاده در این پژوهش از نظر میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در جدول ۳-۱ ارائه شده است.

جدول ۳-۱- ترکیب ۱۰۰ گرم استخوان*

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

* نتایج میانگین سه تکرار است.

۳-۲- مدل سازی استخراج آنزیمی ژلاتین

مدل رگرسیون حاصل از برازش نتایج اندازه گیری راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب محلول ژلاتین حاصل از استخراج آنزیمی برای هر یک از متغیرهای تابع (راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب) دارای ضرایبی می باشد. این ضرایب در جدول ۳-۲ آورده شده اند. نتایج آنالیز واریانس مدل های رگرسیون راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب در استخراج آنزیمی (جدول ۳-۳ و ۳-۵) نشان می دهد که مدل های مذکور نیز با ضرایب همبستگی به ترتیب ۰/۹۵۴، ۰/۹۹۴، ۰/۹۶۶ و ۰/۹۳۵ همگی معنی دار بوده و با نتایج آزمایشها به خوبی برازش داده شده اند. نتایج آنالیز واریانس مدل های رگرسیون در استخراج آنزیمی نشان می دهند که در مدل های رگرسیون راندمان، مقاومت ژل و ویسکوزیته، جملات خطی و درجه دوم معنی دار شده اند. در حالی که در مدل رگرسیون جذب، جملات خطی معنی دار بوده اند. بنابراین برای پیشگویی مقادیر متغیرهای تابع در سطوح مختلف متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی، می توان از مدل های رگرسیون مذکور استفاده نمود.

۳-۲-۱- مدل رگرسیون راندمان

آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر روی مدل رگرسیون راندمان استخراج آنزیمی ژلاتین نشان می دهد که فقط متغیرهای غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی معنی دار شده اند. همچنین ضریب همبستگی راندمان با متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی (جدول ۳-۶) نشانگر اینست که اثر غلظت آنزیم بر راندمان بیش از اثر زمان تیمار آنزیمی می باشد. این امر به دلیل تأثیر حضور محدود آنزیم در برابر سوبسترا می باشد بطوریکه به دلیل محدود بودن غلظت آنزیم، افزایش زمان تیمار آنزیمی نیز نمی

تواند به اندازه غلظت آنزیم بر افزایش فعالیت آنزیمی تاثیر بگذارد. همچنین اثر زمان تیمار آنزیمی بر افزایش راندمان نیز بیش از اثر دمای استخراج می‌باشد.

روند تغییرات راندمان استخراج آنزیمی با متغیرهای غلظت آنزیم، زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج در شکل‌های ۱-۳ و ۲-۳ نشان داده شده‌اند. در این نمودارها عدم تأثیر دمای فرایند بر روی راندمان استخراج آنزیمی مشاهده می‌شوند. این نمودارها همچنین نشان می‌دهند که با افزایش غلظت آنزیم تا حد مشخصی (غلظت ۶ پی پی ام) در کمترین زمان تیمار آنزیمی، راندمان استخراج ژلاتین افزایش می‌یابد، اما پس از آن مقدار راندمان تقریباً ثابت می‌شود. در حالی که با افزایش زمان تیمار آنزیمی، افزایش غلظت آنزیم نیز سبب افزایش راندمان استخراج می‌شود. تأثیر غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی بر روی افزایش راندمان به دلیل هیدرولیز بیشتر پیوندهای پپتیدی زنجیره‌های کلاژن و شکستن آنها به زنجیره‌هایی با وزن مولکولی کمتر می‌باشد [۱۳].

جدول ۲-۳- ضرایب برآورد شده مدل‌های رگرسیون راندمان، بلوم، ویسکوزیته و جذب در استخراج آنزیمی

ضریب	درجه آزادی	راندمان (درصد)	بلوم (گرم)	ویسکوزیته (سانتی پواز)	جذب در ۴۲۰ نانومتر
		y_1	y_2	y_3	y_4
β_0	۱	۱۲/۶۴۷**	۲۱۸/۱۷**	۴/۶۶**	۰/۰۶۴۳۳**
β_1	۱	۱/۶۲۲۵**	۵۷/۷۵**	۰/۰۷۱۲۵	۰/۰۱۲۷۵**
β_2	۱	۱/۳۲۶۲۵**	۷/۵۶۲**	۰/۶۶۵**	۰/۰۰۸۳۷۵*
β_3	۱	۰/۴۴۳۷۵	۴/۹۳۷*	۰/۳۸۱۲۵**	۰/۰۰۵۱۲۵
β_{11}	۱	-۲/۷۱۳۳**	-۲۹/۸۸۳**	-۰/۴۷۱۲۵**	-۰/۰۱۰۱۷*
β_{21}	۱	۰/۴۸۲۵	-۱۴/۳۲۵**	-۰/۰۴۵	۰/۰۰۳۲۵
β_{22}	۱	-۰/۲۹۵۸۳	-۱۵/۹۰۸**	-۰/۳۶۴**	-۰/۰۰۷۴۱۷
β_{31}	۱	۰/۲۱۲۵	-۲/۷۷۵	-۰/۳۴۲۵**	۰/۰۰۱۲۵
β_{32}	۱	۰/۰۹	-۱/۶	۰/۱۰۵*	۰/۰۰۳
β_{33}	۱	-۰/۰۳۰۸۳	-۱۹/۶۵۸**	-۰/۲۲۶۲۵**	-۰/۰۰۰۹۱۷

جدول ۳-۳- آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر روی مدل‌های رگرسیون در استخراج آنزیمی

متغیر	درجه آزادی	مجموع مربعات		
		راندمان (%)	بلوم (گرم)	ویسکوزیته (سانتی پواز)
غلظت آنزیم (X_1)	۴	۴۹/۳۵۵۳**	۳۰۸۲۹**	۱/۳۳۸**
زمان (X_2)	۴	۱۵/۳۵۸۳*	۲۲۲۳/۰۲۵**	۴/۰۷۸۵**
دما (X_3)	۴	۱/۷۹۱۸۵	۱۶۶۲/۹۷**	۱/۸۶۵**

جدول ۳-۴- آنالیز واریانس رگرسیون راندمان، بلوم، ویسکوزیته و جذب در استخراج آنژی

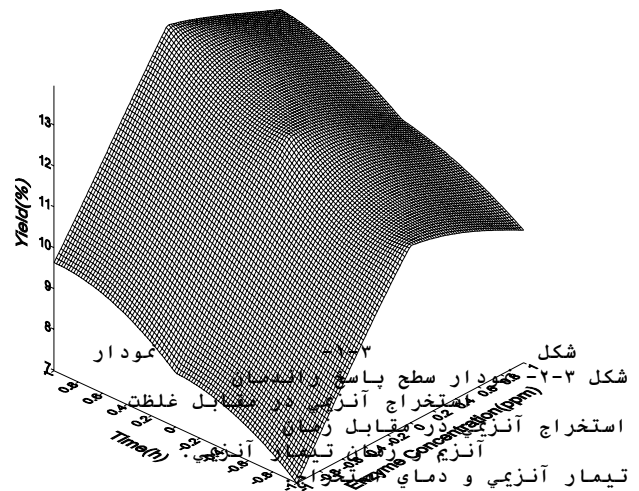
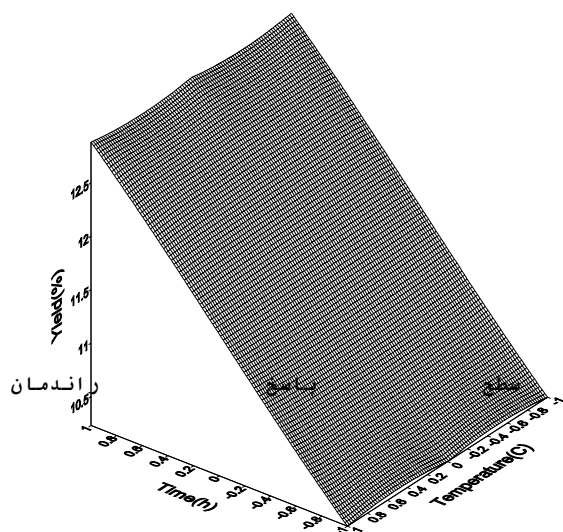
مجموع مربعات				درجه آزادی	منابع تنوع
جذب در ۴۲۰ نانومتر y ₄	ویسکوزیته (سانتی پواز) y ₃	مقاومت ژل (گرم) y ₂	راندمان y ₁ (%)		
۰/۰۰۲۰۷۲**	۴/۷۴۱۲**	۲۷۳۳۳**	۳۶/۷۰۶۹**	۳	خطی
۰/۰۰۰۰۵۴۶	۱/۳۲۲**	۴۹۸۷/۸۳۴**	۲۷/۳۳۸۲**	۳	درجه دوم
۰/۰۰۰۰۰۸۴۵	۰/۰۵۲۱۴**	۸۶۱/۸۶۵**	۱/۱۴۴۲۵	۳	حاصلزرها
۰/۰۰۲۷۰۲*	۶/۵۸۴۶**	۳۳۱۸۳**	۶۵/۱۸۹۳**	۹	مدل
۰/۹۳۵	۰/۹۵	۰/۹۹۸	۰/۹۵۲۶		ضریب همبستگی

جدول ۳-۵- آنالیز باقیمانده های مدل های رگرسیون راندمان، بلوم، ویسکوزیته و جذب ژلاتین استخراج آنژی

مجموع مربعات				درجه آزادی	منابع تنوع
جذب در ۴۲۰ نانومتر	ویسکوزیته (سانتی پواز)	مقاومت ژل (گرم)	راندمان (%)		
۰/۰۰۰۱۳۷	۰/۰۱۷۱	۶۴/۹۸۷*	۳/۲۲۹۲*	۳	عدم برازش
۰/۰۰۰۰۰۵۱	۰/۰۱۵۸	۱/۰۸۶۷	۰/۰۱۴۴۷	۲	خطای خالص
۰/۰۰۰۱۸۸	۰/۰۳۲۹	۶۶/۰۷۴	۳/۲۴۳۷	۵	خطای کل

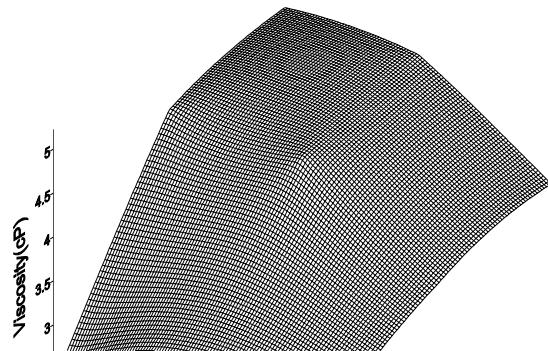
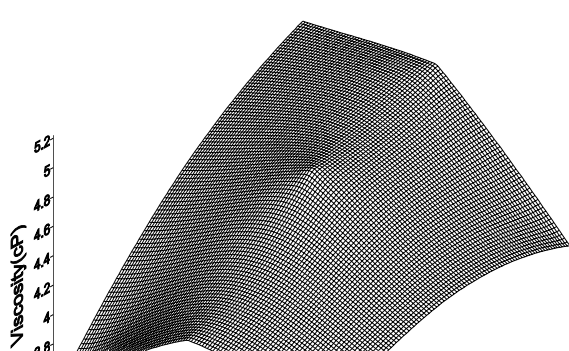
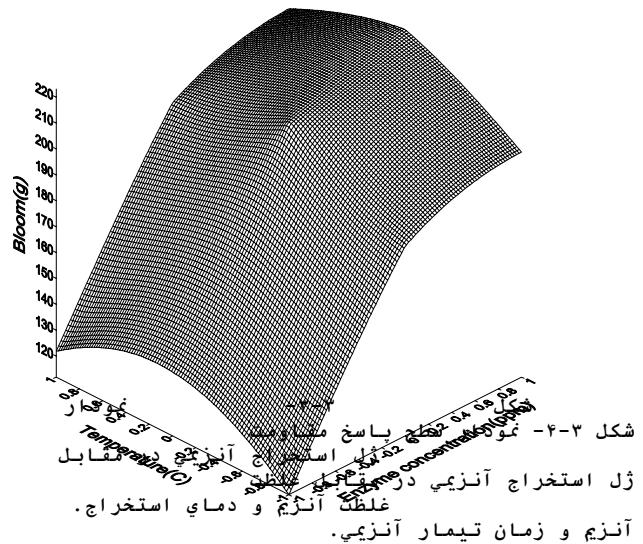
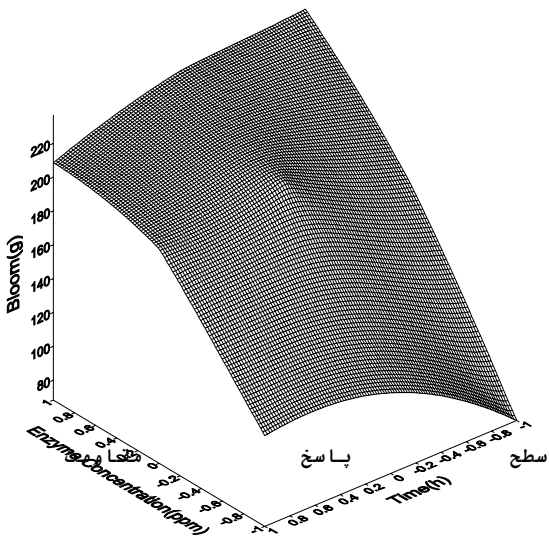
جدول ۳-۶- ضرایب همبستگی میان متغیرهای فرایند استخراج آنژی و متغیرهای تابع

ضریب همبستگی				متغیر
جذب در ۴۲۰ نانومتر	ویسکوزیته (سانتی پواز)	مقاومت ژل (گرم)	راندمان (%)	
۰/۶۷۱	۰/۰۷۸	۰/۶۰۶	۰/۵۵۵	غلظت آنژیم
۰/۴۴۱	۰/۷۳۱	۰/۳۲۱	۰/۴۵۳	زمان تیمار آنژی
۰/۲۷۰	۰/۴۲	-۰/۷۵۰۵	۰/۱۵۲	دمای استخراج



شکل ۳-۲-۲-۳- مدل رگرسیون مقاومت ژل

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



ویسکوزیته	باسخ	سطح	نمودار	۵-	۳-	شکل
غلظت	مقابل	در	آنزیمی	و	استخراج	شکل ۳-۶- نمودار سطح پاسخ ویسکوزیته استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم
آنزیمی.	تیمار	زمان				آنزیم و دمای استخراج.

۳-۲-۳- مدل رگرسیون ویسکوزیته

آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی بر مدل رگرسیون نشان می‌دهد که اثر هر سه متغیر غلظت آنزیم، زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج در مدل معنی‌دار شده است (جدول ۳-۳). ضرایب همبستگی متغیرهای فرایند با ویسکوزیته (جدول ۳-۶) نشانگر اینست که اثر زمان تیمار آنزیمی بر روی مقدار ویسکوزیته ژلاتین حاصل بیش از اثر دمای استخراج می‌باشد. همچنین اثر دمای استخراج بیش از اثر غلظت آنزیم است. روند تغییرات ویسکوزیته در استخراج آنزیمی، در شکل‌های ۳-۵ و ۳-۶ نشان داده شده است. نمودار ۳-۵ و ۳-۶ نشان می‌دهند که در غلظت‌های پائین آنزیم (۲ پی پی ام) اثر متغیرهای زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج بر روی افزایش میزان ویسکوزیته خیلی زیاد است، اما با افزایش غلظت آنزیم اثر متغیرهای مذکور کاهش می‌یابد. افزایش غلظت آنزیم از حدود ۶/۸ پی پی ام به بالا سبب کاهش ویسکوزیته محلول ژلاتین می‌شود. این پدیده به علت فعالیت زیاد آنزیمی و هیدرولیز ژلاتین و در نتیجه کاهش زنجیره‌های با وزن مولکولی بالا (HMW) رخ می‌دهد [۲ و ۵].

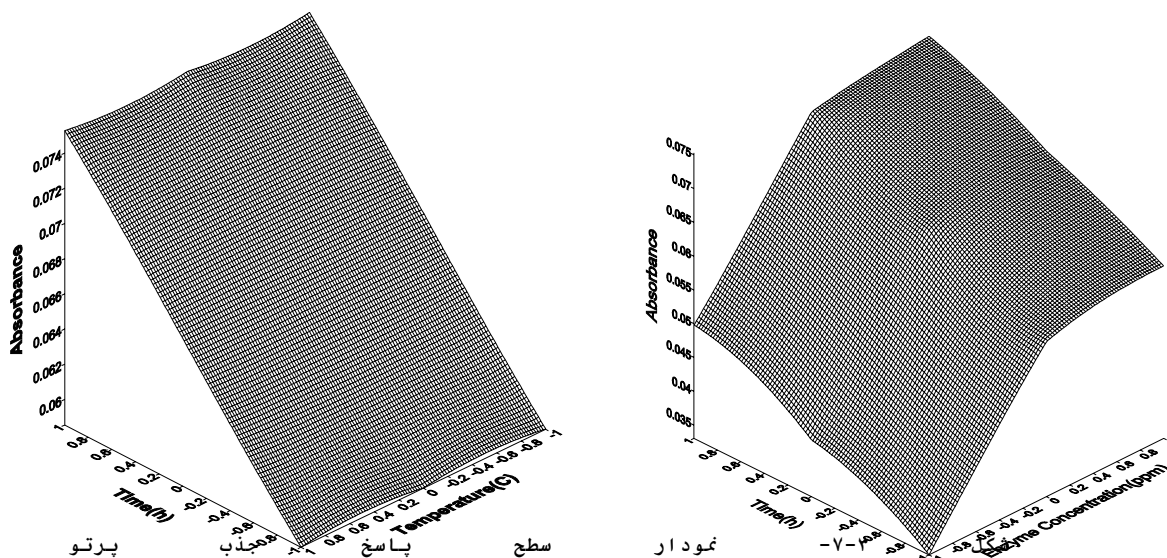
۳-۲-۴- مدل رگرسیون جذب پرتو

آنالیز واریانس اثر کلی متغیرهای فرایند بر مدل رگرسیون جذب پرتو نشان می‌دهد که تنها اثر دو متغیر غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی در مدل معنی‌دار شده است. همچنین ضرایب همبستگی میان متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی و میزان جذب پرتو (جدول ۳-۶) نشان می‌دهد که اثر متغیر غلظت آنزیم بر روی میزان جذب پرتوی محلول ژلاتین بیش از اثر زمان تیمار آنزیمی است. روند تغییرات میزان جذب پرتوی محلول ژلاتین حاصل از استخراج آنزیمی در مقابل غلظت آنزیم، زمان تیمار آنزیمی و دمای استخراج در شکل‌های ۳-۷ و ۳-۸ ارائه شده‌اند. شکل ۳-۸ به خوبی نشان می‌دهند که دمای استخراج تأثیر زیادی بر روی میزان جذب پرتوی محلول ژلاتین ندارد. واضح است که با افزایش غلظت آنزیم و زمان تیمار آنزیمی به دلیل تولید طیفی از ملکولهای ژلاتین با وزن مولکولی خاص که دارای جذب پرتوی بیشتری می‌باشند، میزان جذب محلول ژلاتین نیز افزایش می‌یابد.

۳-۳-۵- تعیین نقطه اپتیمم استخراج آنزیمی

مدلهای رگرسیون راندمان، مقاومت ژل، ویسکوزیته و جذب، بسته به نوع و درجه مدل دارای نقاط سکون می‌باشند. از آنجا که مقدار اپتیمم برای هر یک از متغیرهای تابع مذکور بسته به نوع متغیر متفاوت است، از این رو نمی‌توان فقط از روی نقاط سکون مدلهای رگرسیون، نقاط اپتیمم را یافت [۶]. سطوح پیشگویی شده متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی برای نقاط سکون مدلهای رگرسیون راندمان، استحکام ژل، ویسکوزیته و جذب پرتو در جدول ۳-۷ ارائه شده‌اند. بنابراین می‌توان با انطباق نمودارهای کانتور متغیرهای تابع فوق، نقطه اپتیمم را به صورت ترسیمی به دست آورد. مقادیر متغیرهای فرایند استخراج در نقطه اپتیمم ترسیمی عبارتند از:

- الف- راندمان : غلظت آنزیم ۶/۱ پی پی ام، زمان ۱۵/۶ ساعت، دمای ۷۰ درجه سانتیگراد
- ب- مقاومت ژل : غلظت آنزیم ۹/۱ پی پی ام، زمان ۱۱/۹ ساعت، دمای ۷۰/۳ درجه سانتیگراد
- ج- ویسکوزیته : غلظت آنزیم ۷/۸۶ پی پی ام، زمان ۱۴/۹ ساعت، دمای ۷۷/۵ درجه سانتیگراد
- د- جذب پرتو : غلظت آنزیم ۲/۸ پی پی ام، زمان ۱۰ ساعت، دمای ۶۰ درجه سانتیگراد



شکل ۳-۸- نمودار سطح پاسخ جذب پرتو استخراج آنزیمی در مقابل دمای استخراج و آنزیم آنزیمی و زمان تیمار آنزیمی. مقابل در مقابل غلظت پرتو

جدول ۳-۷- سطوح پیشگویی شده متغیرهای فرایند استخراج آنزیمی، برای مقادیر اپتیمم متغیرهای تابع

سطوح متغیرهای فرایند برای مقادیر ایتیمم				متغیرهای فرایند
جذب در ۴۲۰ نانومتر	ویسکوزیته (سانتیپوآ (ز)	مقاومت ژل (گرم)	راندمان (%)	
۱/۵۱۲۳	-۰/۵۳۰	۰/۵۴۰۳	۱/۹۶۷۴	غلظت آنزیم (X ₁)
۲/۴۹۵۹	۱/۱۶۵۴	-۰/۴۲۲	۷/۶۷۶	زمان تیمار آنزیمی (X ₂)
۷/۹۱۱	۱/۵۱۴	-۲/۵۴۶	۲۵/۱۷۸	دمای استخراج (X ₃)
ماکزیم	ماکزیم	نقطه زینی	ماکزیم	مورفولوژی

۳-۶- تایید مدل^۱

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

۴- نتیجه‌گیری و پیشنهادات

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

منابع :

- رضایی، ع.م.، ا.سلطانی، مقدمه ای بر تحلیل رگرسیون کاربردی، مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۳۷۷
- Francis, F. J., 2000, Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology, John Wiley and Sons, Inc., New York.

\ 3

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