



Evaluation of Gelatin Extracted from Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Skin and Biodegradable Film Fabrication

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mousavi Z.¹ MSc,
Babaei S.^{*1} PhD,
Vardizadeh F.¹ MSc,
Naseri M.¹ PhD

How to cite this article

Mousavi Z, Babaei S, Vardizadeh F, Naseri M. Evaluation of Gelatin Extracted from Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Skin and Biodegradable Film Fabrication. Journal of Fisheries Science and Technology. 2019;8(4):241-249

ABSTRACT

Aims The present study was aimed to extract gelatin from Siberian sturgeon waste and using it in film making.

Materials & Methods Gelatin was extracted using NaOH and HCl. After evaluating the extracted gelatin properties consist of bloom grade, pH, zeta test, melting, and setting temperature and time, the edible film was prepared using casting method.

Findings The results showed that the extraction efficiency of the gelatin was %20.06. In addition, the protein content, pH, degree of gel hardness, and setting temperature and setting time and melting temperature and melting time of gelatin were reported as 79.2±0.6%, 4, 160.2±0.4g, 13.1±0.2°C in 180.3±0.5 seconds and 19.33±0.5°C in 140.66±0.5 seconds, respectively. Zeta potential indicated a positive surface charge in gelatin. The thickness, moisture, solubility, tensile strength, elongation at break, and permeability of gelatin film were reported as 0.05mm, 10.2±1.5%, 79±3.7%, 30.01±0.7MPa, 77.5±3.6%, and 3.54±0.08g mm/h mm²kpa×10⁻⁶, respectively. SEM images of the film showed a smooth structure without cracking. Moreover, the FTIR result depicted the formation of amide bonds in the regions of 3277.62, 1633.92, 1530.11, and 1236.49cm⁻¹.

Conclusion Due to the efficiency and gelatin traits, and the mechanical and physical properties of the edible film, it can be used as a good candidate for the production of biodegradable films in food storage.

Keywords Siberian Sturgeon; Fish Gelatin; Biodegradable Film; FTIR; SEM

CITATION LINKS

[1] Rheological properties of ... [2] Extraction and physico ... [3] Fish processing by-products ... [4] Properties of gelatins from skins ... [5] Optimization of physico-chemical ... [6] Optimization of gelatin extraction ... [7] Development of active gelatin films ... [8] Fish gelatin ... [9] Rheological and mechanical ... [10] The state of world fisheries ... [11] Characterization of edible films ... [12] Development of edible films ... [13] Gonadal stage and sex steroid ... [14] Ontogenetic behavior of Siberian ... [15] Global partnership for ... [16] Official methods of analysis ... [17] Isolation and characterization ... [18] Starch-gelatin film ... [19] Structural and physical properties ... [20] Zeta potential ... [21] A chitosan-gelatin blend ... [22] Production and physicochemical ... [23] Effect of chitosan coatings ... [24] Properties of nano-ZnO ... [25] Investing the effects of ... [26] Characterization of fish-skin ... [27] Functional, antioxidant and film ... [28] Optimization and characterization ... [29] Comparison of recovered ... [30] Storage of dried fish skins on ... [31] Gelatin from cod skins ... [32] Physicochemical properties ... [33] A comparative study on the physical ... [34] Hydroxyproline content ... [35] Effect of freezing fish skins on ... [36] Extracting optimization and ... [37] Fish gelatin: Properties, challenges ... [38] Marine gelatine from rest raw ... [39] Properties of Alaska pollock ... [40] Yield and gel strength of gelatin ... [41] Extraction and evaluation of gelatin ... [42] Autolysis study of bigeye snapper ... [43] Zeta potential determination ... [44] Gelatin as a delivery vehicle ... [45] Fabrication of gelatin-TiO₂ nanocomposite ... [46] Nor-Khaizura MA. Effect of pomegranate ... [47] Quality changes of ... [48] Comparing physico-mechanical ... [49] Fish gelatin films containing aqueous ... [50] Physical properties and antioxidant ... [51] Effect of transglutaminase on properties ... [52] Development of bioactive ... [53] Physicochemical properties ... [54] Properties and application ... [55] Edible and biodegradable starch ... [56] Characterization of edible films ... [57] Effect of clay content ... [58] Effect of fructose and ascorbic ... [59] Application of Fourier transform infrared ... [60] Functional properties of gelatin from ... [61] Effect of heat treatment of film ... [62] Effects of hydrogen peroxide ... [63] Infrared study of gelatin ...

¹Natural Resources & Environmental Engineering Department, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Correspondence

Address: Natural Resources & Environmental Engineering Department, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Fars, Iran. Postal code: 7194684334.
Phone: +98 (71) 36138172
Fax: +98 (71) 32287159
s-babaei@shirazu.ac.ir

Article History

Received: February 10, 2019
Accepted: April 21, 2019
ePublished: June 10, 2020

ارزیابی ژلاتین استخراج شده از پوست تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) و تولید فیلم زیست تخریب پذیر

زهرا موسوی MSc

بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

صدیقه بابایی PhD

بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

فرزانه وردی زاده MSc

بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

محمود ناصری PhD

بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده

اهداف: در مطالعه حاضر، استخراج ژلاتین از زایدات تاس ماهی سیبری و استفاده از آن در تهیه فیلم، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: استخراج ژلاتین به روش توام اسید و باز انجام شد. بعد از ارزیابی خصوصیات ژلاتین استخراج شده شامل درجه بلوم، pH، تست زتا، دما و زمان باز و بسته شدن ژل، از محصول نهایی به روش کاستینگ فیلم تولید شد.

یافته ها: نتایج نشان داد بازده استخراج ژلاتین از زایدات تاس ماهی ۲۰/۰۶٪ بود. همچنین میزان پروتئین، pH، درجه سختی ژل و دما و زمان بسته و باز شدن ژل به ترتیب، ۷۹/۲±۰/۶٪، ۴/۴±۰/۲، ۱۶۰/۲±۰/۴ گرم، ۱۳/۱±۰/۲°C در ۱۸۰/۳±۰/۵ ثانیه و ۱۹/۳۳±۰/۵°C در ۱۴۰/۶۶±۰/۵ ثانیه گزارش شد. ارزیابی پتانسیل زتا حاکی از مثبت بودن بار سطحی ژلاتین بود. فیلم خوراکی حاصل از ژلاتین دارای ضخامت، رطوبت، حلالیت، مقاومت کششی، کشش تا لحظه پاره شدن و نفوذپذیری به ترتیب، ۰/۵ میلی متر، ۱۰/۲±۰/۵٪، ۷۹±۳/۷٪، ۳۰/۱±۰/۷٪، ۳۰/۵±۳/۶ میلی مترمربع کیلوپاسکال بود. تصاویر حاصل از SEM در فیلم، ساختاری صاف و بدون ترک خوردگی را نشان داد. همچنین نتایج حاصل از FTIR گویای شکل گیری باندهای آمیدی در نواحی ۳۲۷۷/۶۲، ۱۶۳۳/۹۲، ۱۵۳۰/۱۱ و ۱۲۳۶/۴۹ cm⁻¹ بود.

نتیجه گیری: با توجه به بازده و خصوصیات ژلاتین و خصوصیات مکانیکی و فیزیکی فیلم حاصل، می توان از آن برای تهیه فیلم های زیست تخریب پذیر در نگهداری مواد غذایی بهره برد.

کلیدواژه ها: تاس ماهی سیبری، ژلاتین ماهی، فیلم زیست تخریب پذیر، SEM، FTIR

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۲

*نویسنده مسئول: s-babaei@shirazu.ac.ir

مقدمه

ژلاتین پلی پپتیدی است که از هیدرولیز گرمایی کلاژن به دست می آید و کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی، دارویی و صنعت دارد [1]. منبع اصلی تولید ژلاتین، پوست خوک و گاو است، اما به دلیل بیماری های دامی و نگرانی های مذهبی توسط جوامع یهودی و مسلمان برای استفاده از گوشت و محصولات جانبی خوک، بررسی و استفاده از سایر منابع به منظور جایگزینی تولید ژلاتین ضروری

است. براساس مطالعات، ژلاتین حاصل از زایدات ماهی می تواند گزینه ای مناسب برای جایگزینی پوست پستانداران به منظور تولید ژلاتین باشد [2]. فرآوری آبزیان، به مقدار زیادی باعث تولید پسماند می شود. تقریباً ۳۰٪ زایدات فرآوری استخوان، باله و پوست است. این دورریزها حاوی مقادیر زیادی کلاژن هستند، بنابراین می توانند یک ماده خام ارزشمند برای دستیابی به ژلاتین باشند [3]. در این زمینه ژلاتین از پوست ماهی تیلایپای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) و نیل [3, 4] (*Oreochromis nilotica*)، پوست قزل آلا رنگین کمان [5] (*Oncorhynchus mykiss*) و استخوان گربه ماهی [6] (*Clarias gariepinu*) استحصال شده است.

ژلاتین ماهی، زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و غیرسمی است. بنابراین پتانسیل بالایی برای تولید فیلم های خوراکی دارد. علاوه بر این، از آن می توان به عنوان حاملی برای ترکیبات زیست فعال بهره برداری کرد [7]. دمای ذوب ژلاتین در مقایسه با سایر مواد ژل ساز مانند نشاسته، آلژینات، آگار و غیره، کمتر از ۳۵°C است، که این دما از دمای بدن انسان پایین تر است و باعث می شود ژلاتین از نظر جنبه های حسی، به ویژه رهاسازی طعم، بی نظیر باشد. این ویژگی منحصر به فرد برای برخی از کاربردها در صنعت غذا و دارو مهم تلقی شده است [8]. ژلاتین حاوی مقادیر زیادی اسید آمینه های پرولین، هیدروکسی پرولین، گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، لیزین، هیدروکسی لیزین، آرژنین و هیستیدین است که عامل اصلی استحکام و سختی ژل آن، دو اسید آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین گزارش شده است [9].

با توجه به حجم انبوه زایدات کارخانجات فرآوری آبزیان، فیلم های تهیه شده از این ترکیبات موجب تولید ارزش افزوده قابل توجهی خواهد بود. در این فرآیند هزینه ماده اولیه بسیار کم و از آلودگی زیست محیطی (حاصل از دفع این زایدات) جلوگیری خواهد شد. بر پایه مطالعات پیشین فیلم های تولید شده از ژلاتین ماهی، خوراکی و دارای ترکیبات زیست فعال یا با ارزش افزوده است [10]. در این زمینه از پوست ماهی سرخو (*Priacanthus macracanthus*) ژلاتین استخراج و از آن در تهیه فیلم خوراکی استفاده شده است که این فیلم ضخامت و خواص مکانیکی مناسبی داشت، اما نفوذپذیری آن در برابر بخار آب پایین بود [11]. فیلم تهیه شده از ژلاتین اسکوئید کوتاه باله آرژانتینی (*Illex argentes*) نیز دارای خواص قابل توجهی بود [12].

تاس ماهی سیبری یکی از انواع ماهیان خاویاری است که در سراسر جهان برای تولید گوشت و خاویار مورد استفاده قرار می گیرد [13]. اشغال زیستگاه های متنوع و تحمل دامنه های اکولوژیکی مختلف توسط این گونه، منجر به انعطاف پذیری فنوتیپی و فیزیولوژیکی قابل توجهی شده است. این انعطاف پذیری پایه ای برای افزایش پرورش ماهیان خاویاری سیبری است و در حال حاضر این ماهی رایج ترین گونه ماهی خاویاری است که در اروپا پرورش داده می شود [14]. تولید جهانی تاس ماهی سیبری در سال ۲۰۱۷ معادل ۵۹۰ تن گزارش شد [15].

اسیدسولفوریک غلیظ و کاتالیزور نمونه هضم، سپس نیتروژن به وسیله سود به سولفات آمونیوم تبدیل، متعاقباً در اسیدبوریک جذب شد و در پایان از طریق تیتراسیون با هیدروکلریک اسید مقدار نیتروژن تعیین شد. میزان پروتئین با استفاده از فرمول زیر مورد محاسبه قرار گرفت [16]:

$14 \times 25 \times 6 \times$ نرمالیت اسید $\times$ (اسید مصرفی نمونه شاهد-حجم اسید مصرفی نمونه آزمایش) = پروتئین (درصد)

برای برآورد مقدار خاکستر، روش کار بر مبنای از بین بردن مواد آلی و باقیمانده مواد معدنی در دمای 550°C در کوره (Isuzu؛ ژاپن) انجام شد. درصد خاکستر طبق فرمول زیر محاسبه شد [16]:

$$100 \times \frac{\text{وزن بوته چینی} - \text{وزن خاکستر و بوته چینی}}{\text{وزن نمونه اولیه}} = \text{خاکستر (درصد)}$$

اندازه گیری pH

pH محلول ژلاتین طبق استاندارد ملی ایران با تهیه ۱ گرم ژلاتین در ۱۰۰ میلی لیتر آب و با استفاده از دستگاه pH سنج STARTER3000 (متروم؛ سوئیس) اندازه گیری شد [17].

تعیین دما و زمان بسته شدن ژل

برای تعیین دمای بستن ژلاتین، محلول ۱۰٪ (وزنی/حجمی) ژلاتین ساخته و پس از حل کردن در حمام آب گرم حدود ۳۰ میلی لیتر از آن به لوله آزمایش و سپس به حمام آب 40°C منتقل شد. سپس حمام آب به آرامی با افزودن آب سرد با دمای 20°C در فواصل زمانی ۱۵ ثانیه سرد شد. در این حالت دماسنج در محلول قرار داده و هر ۱۵ ثانیه از آن خارج شد. درجه حرارتی و زمانی که دیگر در آن هیچ قطره ای از روی دماسنج در هنگام خارج کردن از آن نچکد، به عنوان درجه حرارت و زمان بستن ژلاتین ثبت شد [12].

تعیین دما و زمان باز شدن ژل

برای تعیین دما و زمان باز شدن ژلاتین، محلول ۱۰٪ (وزنی/حجمی) ژلاتین آماده و در یخچال در دمای 7°C به مدت ۱۶-۱۸ ساعت قرار گرفت و سپس به حمام آب 10°C منتقل و به تدریج به آن آب گرم با دمای 45°C اضافه شد. زمانی که شاخص از محلول به راحتی جدا شد، به عنوان زمان باز شدن و دمایی که دماسنج به راحتی جدا شد، به عنوان دمای باز شدن در نظر گرفته شد [12].

تعیین درجه سختی ژل (درجه بلوم)

سختی ژلاتین استخراج شده از پوست تاس ماهی سیبری با استفاده از دستگاه بافت سنج (Surrey) TX-XT2 Texture Analyser انگلستان اندازه گیری شد. ژلاتین (۶۷٪) در آب مقطر به مدت ۱ ساعت قرار داده شد تا به خوبی آب جذب کند و هیدراته شود. سپس روی هیترمگنت با دمای 55°C به خوبی هموزن و محلول حاصله در دمای 7°C به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت نگهداری شد. سپس استحکام ژل از طریق اندازه گیری حداکثر نیرویی که موجب نفوذ پروب استاندارد به میزان ۴ میلی متر و با سرعت ۵/۰ میلی متر در ثانیه در ژل می شود، به دست آمد [18].

مطالعه ژلاتین حاصل از پوست تاس ماهی سیبری برای افزایش کارایی تولید محصولات شیلاتی ارزان قیمت و همچنین تولید فیلم خوراکی زیست تخریب پذیر با آن دارای اهمیت بسیاری است و تاکنون گزارشی در این زمینه یافت نشده است. هدف مطالعه حاضر، استخراج ژلاتین از پسماندهای پوست تاس ماهی سیبری و بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آن شامل بازده استخراج، درصد پروتئین، pH، تعیین بار سطحی، درجه سختی، دما و زمان باز و بسته شدن ژل و همچنین تهیه فیلم خوراکی از ژلاتین و بررسی خواص فیزیکی و مکانیکی آن شامل ضخامت، رطوبت، حلالیت، مقاومت کششی، کشش تا لحظه پاره شدن، نفوذپذیری به بخار آب، FTIR و SEM است.

مواد و روش ها

تهیه زایدات تاس ماهی سیبری

زایدات تاس ماهی سیبری به صورت منجمد شده از مزرعه پرورش ماهیان خاویاری قره برون در شهر ساری واقع شده در استان مازندران تهیه و سپس به صورت منجمد و یخ پوش شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز ارسال شدند. پس از انجماد زایدات پوست، تمیز و به قطعات کوچک بریده و در نهایت تا زمان استفاده در فریزر با دمای -20°C نگهداری شدند.

استخراج ژلاتین

استخراج ژلاتین از پوست تاس ماهی سیبری با پیش تیمار قلبایی و اسیدی انجام شد. ابتدا چربی ها و پروتئین غیر کلژنی از پوست، با استفاده از سود ۴/۰ نرمال با نسبت ۵:۱ (وزنی/حجمی؛ ۱۰۰ گرم پوست و ۵۰۰ میلی لیتر سود) به مدت یک ساعت در دمای 4°C تا 5°C از بین برده شدند و سپس برای خنثی سازی pH، نمونه حاصل با آب مقطر شست و شو داده شد. حذف مواد معدنی و املاح از پوست با استفاده از اسید کلریدریک ۲/۰ نرمال با نسبت ۵:۱ (وزنی/حجمی) به مدت یک ساعت در دمای 4°C تا 5°C یخچال انجام و پس از آن نمونه حاصل با آب مقطر شست و شو داده شد. پس از شست و شوی نهایی، ژلاتین از پوست های تیمار یافته، در آب مقطر به نسبت ۶:۱ (وزنی/حجمی) در دمای 55°C در انکوباتور شیکردار (ورقا تجهیز؛ ایران) به مدت ۱۶-۱۷ ساعت استخراج و سپس با عبور از پارچه تنظیف و قیف بوخنر فیلتر شد. در نهایت ژلاتین توسط خشک کن انجمادی LTD، FD-5003-B (صنعت پرداز دنا؛ ایران) موجود در پارک علم و فناوری استان فارس خشک شد [15].

آزمون های ژلاتین

بازده استخراج

بازده استخراج ژلاتین با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [15]:

$$100 \times \frac{\text{وزن ژلاتین (گرم)}}{\text{وزن پوست (گرم)}} = \text{بازده ژلاتین (درصد)}$$

آنالیز تقریبی

به منظور تعیین درصد پروتئین ژلاتین از روش کدال و دستگاه کدالال V50 (بخشی؛ ایران) استفاده شد. در این روش در حضور

پتانسیل زتا

این آزمون برای دستیابی به بار الکتریکی سطحی ژلاتین استخراج شده با دستگاه پراکندگی دینامیکی نور SZ-100 (Horiba؛ ژاپن) انجام شد. به این صورت که محلول رقیقی از ژلاتین در آب مقطر تهیه (ژلاتین ۱٪) و توسط دستگاه تعیین بار سطحی اندازه گیری شد [19]. نمونه به سلول زتا، در دمای ۲۵°C و ولتاژ معادل ۳/۳ ولت منتقل شد و مورد ارزیابی قرار گرفت.

ساخت فیلم

برای تولید فیلم از ژلاتین تاس ماهی سیبری از روش کستینگ بهره برداری شد [20]. ژلاتین تولید شده به میزان ۳٪ (وزنی/حجمی) در آب مقطر حل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵°C حرارت داده شد. همچنین ۷۵/۰ گرم گلیسرول به عنوان پلاستی سایزر به آن اضافه و به مدت ۲ ساعت روی هیتر مگنت دار هموژن شد. میزان ۱۵ میلی لیتر از محلول فیلم در پلیت های ۱۰ سانتی متری ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۵۰°C خشک شد [21].

آزمون های فیزیکی فیلم

اندازه گیری ضخامت

برای اندازه گیری ضخامت فیلم ها از دستگاه میکرومتر No. 293 (Mitutovo؛ ژاپن)، با دقت ۰/۰۰۱ میلی متر استفاده شد. اندازه گیری ها به صورت تصادفی در پنج نقطه از نمونه تکرار و میانگین ضخامت این نقاط برای تعیین ویژگی های فیزیکی و مکانیکی فیلم ها استفاده شد [22].

رطوبت

مقدار مشخصی از نمونه ها توزین و داخل پلیت های شیشه ای قرار داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵°C خشک شد. پس از این مدت، نمونه همراه با پلیت خارج و پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدداً توزین شد. محتوای رطوبت فیلم ها بر پایه وزن مرطوب از طریق رابطه زیر مورد محاسبه قرار گرفت [23]:

$$\text{رطوبت (درصد)} = \frac{\text{وزن نمونه خشک} - \text{وزن نمونه تر}}{\text{وزن نمونه تر}} \times 100$$

حلالیت در آب

به منظور تعیین حلالیت در آب، فیلم های بدون رطوبت با اندازه ۲×۲ سانتی متر وزن و متعاقباً در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر غوطه ور شدند و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس نمونه ها در دمای ۱۰۵°C (تا وزن ثابت) خشک شدند. حلالیت با اختلاف وزن بین ماده خشک که در آب حل نشده و وزن اولیه قبل از غوطه وری تعیین شد. سه تکرار برای هر فیلم انجام و نتایج حلالیت به صورت درصد گزارش شد [22].

$$\text{حلالیت (درصد)} = \frac{\text{وزن فیلم خشک پس از غوطه وری} - \text{وزن ماده خشک اولیه}}{\text{وزن ماده خشک اولیه}} \times 100$$

اندازه گیری میزان نفوذ پذیری در برابر بخار آب

سنجش میزان نفوذ پذیری فیلم ها نسبت به بخار آب طبق استاندارد ASTM E96 محاسبه شد. فنجان هایی با قطر ۳×۳×۴ سانتی متر

حاوی ۴ گرم کلرید کلسیم بدون آب (رطوبت نسبی برابر صفر) و یک فنجان کنترل (خالی از کلرید کلسیم) در بندی شد. فنجان ها در یک محفظه حاوی سدیم کلرید فوق اشباع (رطوبت نسبی ۷۵٪) قرار گرفتند. این اختلاف رطوبت میان دو سمت فیلم منجر به ایجاد یک فشار بخار به اندازه ۱۷۵۳/۵۵ پاسکال می شود. انتقال بخار آب از طریق افزایش وزن فنجان تشخیص داده شد. تغییرات وزن فنجان (با فواصل ساعتی) با استفاده از ترازویی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری و نمودار افزایش وزن به عنوان تابعی از زمان رسم شد. در تمام نمونه ها با رسم منحنی تغییرات وزن سلول نسبت به زمان، یک معادله درجه یک بود. نرخ انتقال بخار آب بر حسب گرم، میلی متر بر ساعت، میلی متر مربع کیلو پاسکال معادل با شیب خطوط حاصل، تقسیم بر سطح سلول است که از طریق رابطه زیر محاسبه شد [23]:

$$\text{ضخامت (میلی متر)} \times \text{شیب خط} = \frac{\text{میزان نفوذ پذیری}}{\text{فشار بخار داخل فنجان} - \text{فشار بخار بیرون فنجان}} \times \text{سطح فنجان (میلی متر مربع)}$$

آزمون های مکانیکی فیلم

اندازه گیری میزان مقاومت کششی (TS) و کشش تا لحظه پاره شدن (درصد E) فیلم ها با دستگاه بافت سنج با استفاده از استاندارد ASTM D882-02 (۲۰۰۲) اندازه گیری شد. ابتدا نمونه های فیلم به شکل مستطیل به ابعاد ۱×۶ سانتی متر مربع بریده و در دسیکاتور حاوی نیترات منیزیم (برای ایجاد رطوبت نسبی ۵۳٪) و در دمای ۲۵°C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس بین دو فک دستگاه قرار داده شدند. فاصله اولیه بین دو فک و سرعت حرکت فک بالایی به ترتیب برابر ۵۰ میلی متر و ۵۰ میلی متر بر دقیقه تعیین شد و داده ها توسط کامپیوتر ثبت شدند [23]. مقاومت کششی فیلم ها از رابطه زیر مورد محاسبه قرار گرفت:

$$\text{ضخامت فیلم} \times \text{عرض فیلم} = \frac{\text{مقاومت کششی}}{\text{حداکثر نیرو در لحظه پاره شدن}}$$

طیف سنج FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)

از دستگاه طیف سنج FTIR مدل Tensor II (Bruker؛ آلمان) به منظور ارزیابی تعامل بین گروه های عملکردی در ماتریس فیلم در طول موج ۴۰۰۰-۴۰۰ cm⁻¹ استفاده شد.

آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای ارزیابی اتصال و تشکیل پیوند بر سطح فیلم، از سطح نمونه ها به کمک دستگاه SEM مدل Vega 3 (TESCAN؛ جمهوری چک) تصویر برداری شد. نتایج حاصل، بیانگر تشکیل یا عدم تشکیل ساختارهای پیوسته و یکنواخت در فیلم مورد نظر است و همچنین بیان کننده این مطلب است که آیا زنجیرهای پلیمری درگیری خوبی با یکدیگر داشته اند؟ [24]. ابتدا فیلم ها در ابعاد بسیار کوچک بریده و به کمک چسب نقره روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. پایه ها در یک دستگاه پوشش دهنده/پاشنده طلا مدل R-ES150Q

هیدروژنی بین مولکول آب آزاد و گروه هیدروکسیل هیدروکسی پرولین در ژلاتین هستند [35]. بنابراین در شبکه ژلی، هر چه مقدار این دو آمینواسید بیشتر باشد (با توجه به گونه ماهی)، ژل در دمای پایین تری می بندد.

همچنین در مطالعه حاضر، دمای باز شدن ژل برابر با $19/33 \pm 0/57^\circ\text{C}$ در $140/66 \pm 0/57$ ثانیه بود. دمای باز شدن ژل برای ماهی مرکب 17°C [30] و برای ماهی تن زرد باله، $36/24/5^\circ\text{C}$ گزارش شده است. ژلاتین یک ژل برگشت پذیر با حرارت است و وقتی دما به بالای یک نقطه ویژه (نقطه ذوب ژل) می رسد، شروع به ذوب شدن می کند. نقاط ذوب معمولاً برای ژلاتین ماهی در محدوده 11°C تا 28°C قرار دارد [37]. حضور مقدار بالای زنجیره های آلفا ۱ و آلفا ۲ در ساختار ژلاتین، وزن مولکولی زنجیره ها و ترکیب آمینواسیدها نیز بر نقطه ذوب ژلاتین اثر می گذارند [38].

درجه سختی ژل (درجه بلوم)

استحکام ژل مهم ترین خاصیت فیزیکی یک ژلاتین است. در این مطالعه، ژلاتین استخراج شده مقاومت ژل نسبتاً بالایی را نشان داد ($160/23 \pm 0/4$ گرم) که این مقدار بهتر از ژلاتین های استخراج شده از ماهیان سردابی شامل ماهی آلاسکا پولاک (*Theragra chalcogramma*) و سالمون (*Salmo salar*) که به ترتیب ۹۸ و 108 گرم بود، است [39, 40]. در حالی که قدرت ژل از ژلاتین ماهیان گرم آبی مانند تن زرد باله (*Thunnus albacares*) و گربه ماهی (*Clarias batrachus*)، به ترتیب معادل 226 و 252 گرم، کمتر بود [32, 41]. این تفاوت ها ممکن است به دلیل غلظت اسیدهای آمینه به ویژه پرولین و هیدروکسی پرولین در ژلاتین ماهیان باشد. میزان پرولین و هیدروکسی پرولین برای ژلاتین های پستانداران تقریباً 3% و برای ژلاتین های ماهی 17 تا 25% است [2] و احتمالاً این دلیل بر درجه بلوم پایین تر ژلاتین ماهی نسبت به پستانداران است. علاوه بر آن عوامل دیگری از جمله اندازه زنجیره های پروتئین، غلظت ژلاتین، توزیع وزن مولکولی ژلاتین و همچنین pH نیز سبب تفاوت در قدرت ژلی ژلاتین می شوند [31, 42]. ژل های کوچکتر و سفت تر ژلاتین با تنظیم pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک شکل می گیرند، جایی که زنجیره های پروتئین خنثی تر خواهند بود، بنابراین پلیمرهای ژلاتینی به یکدیگر نزدیکتر می شوند و در نتیجه باعث سختی بیشتر ژلاتین می شوند [32].

پتانسیل زتا

ذرات در محلول به دلیل وجود خاصیت های یونی، همچنین مواد سازنده غشا (مانند پروتئین ها، چربی ها و قندها) و پخش بار در سطح غشای آنها دارای یک بار الکتریکی در سطح غشا هستند. از طرفی، پتانسیلی که بین سطح ذره و مایع وجود دارد، با فاصله از سطح ذره تغییر می کند. این پتانسیل در صفحه لغزش، پتانسیل زتا نامیده می شود [43]. طبق نمودار ۱، ژلاتین دارای بار سطحی مثبت بود. از سویی مثبت یا منفی بودن بار سطحی بستگی به محدوده pH ژلاتین دارد که بار سطحی ژلاتین با pH برابر ۴، به دلیل ویژگی کاتیونی آن در این محدوده مثبت گزارش شده است [44, 45].

(Quorum Technologies؛ انگلستان) پوشش داده شدند و در نهایت تصویربرداری از نمونه ها در بزرگنمایی های مختلف انجام شد.

یافته ها و بحث

بازده استخراج

در مطالعه حاضر، بازده استخراج ژلاتین $20/06 \pm 0/11\%$ بود. در حالی که مطالعات مشابه برای استخراج ژلاتین ماهی این بازده را برای گونه فیل ماهی بلوگا، 21% [25]، استخوان گربه ماهی، $3/35\%$ [6]، پوست قزل آلائی رنگین کمان، $9/36\%$ [5] و پوست و استخوان ماهی سوف نیل، $8/2\%$ [2] گزارش کرده اند. به طور کلی متفاوت بودن بازده استخراج ژلاتین بستگی به کیفیت نوع ماده اولیه، گونه ماهی و استفاده از غلظت های متفاوت اسیدها، مواد قلیایی و دما دارد. اسیدها برای استخراج ژلاتین حتی در غلظت پایین نیز نقش های خود از جمله دمیتراله کردن (حذف مواد معدنی)، شکسته شدن پیوندهای کلژن و غیره را ایفا می کنند [26].

آنالیز تقریبی

میزان پروتئین و خاکستر ژلاتین استخراج شده از تاس ماهی سیبری، به ترتیب $79/26 \pm 0/64\%$ و $1/63\%$ بودند، این در حالی است که همین مواد استخراج شده از ماهی تن (*Thunnus thynnus*)، به ترتیب $91/31\%$ و $0/82\%$ ، از پوست ماهی کوماکوما (*Brachyplatystoma filamentosum*)، $72/76\%$ و $0/13\%$ و از ژلاتین فلس کپور (*Cyprinus carpio*) $95/05\%$ و $0/01\%$ گزارش شد [27-29]. عمدتاً محتوای بالای خاکستر در ژلاتین به دلیل داشتن ماده معدنی بالاتر در آن است. میزان پروتئین و خاکستر ژلاتین به میزان کلژن موجود در پوست، نحوه استخراج، منبع، سن حیوان و گونه بستگی دارد [30].

pH

میزان pH ژلاتین استخراج شده از تاس ماهی سیبری برابر با ۴ بود، که تفاوت ها در میزان pH، به مواد افزودنی برای استخراج ژلاتین بستگی دارد. به عنوان مثال pH ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی کاد (*Gadus morhua*) با استفاده از سولفوریک اسید برابر با $2/7$ [31] و ژلاتین استخراج شده با استفاده از محلول سود $8/0$ نرمال از گربه ماهی (*Clarias batrachus*)، مارماهی (*Channa striatus*) و تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) به ترتیب، $5/22$ ، $5/39$ و $5/05$ گزارش شده است [32].

دما و زمان بسته و باز شدن ژل

در مطالعه حاضر، دمای بسته شدن ژل $13/16 \pm 0/28^\circ\text{C}$ در $180/33 \pm 0/57$ ثانیه بود. دما و زمان بسته شدن ژل ژلاتین برای پوست ماهی روهو (*Labeo rohita*) $18/25^\circ\text{C}$ در 106 ثانیه و برای کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) $17/96^\circ\text{C}$ در 103 ثانیه گزارش شد [33]. تفاوت در دمای تشکیل ژل ژلاتین ماهی، در ارتباط با ترکیب آمینواسیدهای هیدروکسی پرولین و پرولین در آن است [34]. ژلاتین قابلیت فراوانی در تشکیل باندهای هیدروژنی با مولکول های آب برای تشکیل یک ژل سه بعدی پایدار دارد که هیدروکسی پرولین و پرولین مسئول پایداری ساختار مارپیچ سه گانه از طریق پیوند

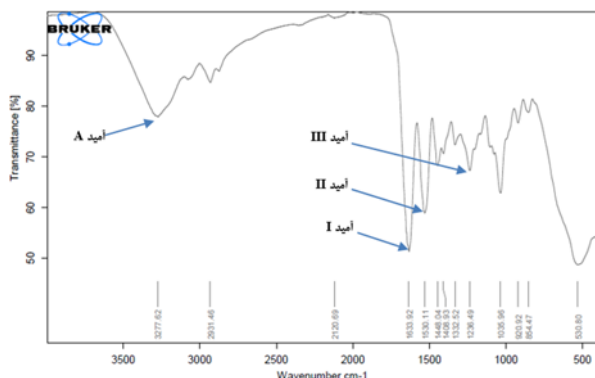
نتایج آزمون‌های مکانیکی فیلم

استحکام کششی و افزایش طول تا لحظه پاره‌شدن

استحکام کششی یا مقاومت کششی شاخصی برای سنجش استحکام فیلم است که به ساختار شیمیایی مولکول‌ها یا به هم پیوستگی زنجیرهای پلیمر در بستر عرضی فیلم‌ها بستگی دارد. افزایش طول تا لحظه پاره‌شدن نیز معیاری برای کشسانی فیلم قبل از پارگی است که هر دو از پارامترهای مهم در ارزیابی فیلم‌های بسته‌بندی محسوب می‌شوند [55]. فیلم ژلاتین تاس‌ماهی سیبری دارای مقاومت کششی $30 \pm 0.01/0.01/0.01$ مگاپاسکال و کشش تا لحظه پاره‌شدن $77/58 \pm 3/6$ % بود. خواص مکانیکی فیلم‌های ژلاتینی تحت تأثیر میزان محتوای مارپیچ سه‌گانه قرار می‌گیرد که ارتباط بالایی بین مقاومت کششی و محتوای زنجیر آلفا ژلاتین وجود دارد. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که کاهش یا افزایش مقاومت کششی می‌تواند ناشی از تخریب یا عدم تخریب ساختار سه‌گانه در اثر هیدرولیز اسیدی و قلیایی باشد [56]. این نتایج با یافته‌های ونگ و همکاران [56]، به و همکاران [57] و گوئرو و همکاران [58] مطابقت داشت.

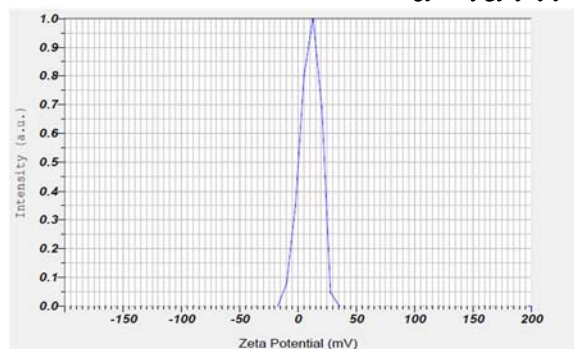
طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR)

این روش براساس جذب تابش فروسرخ و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چنداتمی عمدتاً برای شناسایی ترکیبات آلی به کار می‌رود و طیف‌های این ترکیبات معمولاً پیچیده هستند و تعداد زیادی پیک دارند که می‌توانند برای اهداف مقایسه‌ای به کار گرفته شوند [59]. نتایج مربوط به واکنش‌های شکل‌گرفته در فیلم خوراکی تولیدشده از ژلاتین تاس‌ماهی سیبری حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز در نمودار ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲) طیف‌سنجی FTIR فیلم خوراکی ژلاتین تاس‌ماهی سیبری

طبق نمودار، باندهای واقع در طول موج‌های ۳۲۷۷، ۱۶۳۳، ۱۵۳۰ و 1236 cm^{-1} به ترتیب به آمید A، آمید I، آمید II و آمید III مربوط هستند که در فیلم‌های خوراکی متنوع به هم شباهت دارند [60]. آمید A نشان‌دهنده C=O (کششی) همراه با پیوند هیدروژنی (N-H کششی/ OH کششی)، آمید I نشان‌دهنده C=O کششی پیوند هیدروژنی به همراه COO ، آمید II ناشی از ارتعاشات خمشی گروه N-H و ارتعاشات کششی گروه C-N و آمید III به ارتعاشات



نمودار ۱) تست پتانسیل زتا- بار سطحی ژلاتین

نتایج آزمون‌های فیزیکی فیلم

رطوبت و حلالیت

میزان رطوبت فیلم حدود $10 \pm 1/5$ % بود. طبق تحقیقات، رطوبت حاصل از فیلم تهیه‌شده از ژلاتین پوست ماهیان سردآبی و پوست تیلپایا به ترتیب ۱۱ % و ۹/۵ % بود [46, 47]. رطوبت فیلم ناشی از خاصیت آب‌دوست بودن و همچنین فراوانی گروه هیدروکسیل در ژلاتین است [48]. فیلم ژلاتین تاس‌ماهی سیبری از حلالیت بالایی (۷۹/۰۴ ± ۳/۷) % برخوردار بود. فیلم‌های تهیه‌شده از ژلاتین پوست ماهی سالمون و پوست ماهیان سردآبی به ترتیب ۸۸ % و ۶۳ % بود [46, 49]. حلالیت یکی از ویژگی‌های غیرمطلوب مهم فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر است که مقاومت فیلم نسبت به محیط‌های حاوی رطوبت مثل مواد گوشتی را کاهش خواهد داد [50].

ژلاتین ماهی به دلیل داشتن مقدار پایین‌تر آمینواسیدهای پرولین و هیدروکسی‌پرولین نسبت به ژلاتین گاوی و خوک (پستانداران) حلالیت بالاتری دارد [51]. استفاده از ترکیبات اتصال‌دهنده عرضی مثل دی‌آلدئیدها و یا آنزیم‌های کراس‌لینک‌کننده می‌تواند حلالیت فیلم را کاهش دهد [52].

در مطالعه حاضر، میزان ضخامت فیلم ژلاتین تاس‌ماهی سیبری نیز ۵/۰ میلی‌متر گزارش شد.

نفوذپذیری

نفوذپذیری به بخار آب یکی از شاخصه‌های مهم پلیمرهای مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی است. فیلم‌های پروتئینی به دلیل داشتن گروه‌های آب‌دوست نفوذپذیری بالایی نسبت به بخار آب دارند. این ضعف در فیلم‌های حاصل از ژلاتین تاس‌ماهی سیبری نیز مشاهده شد، به طوری که میزان نفوذپذیری این فیلم‌ها $3/54 \pm 0/08$ گرم، میلی‌متر/ساعت، میلی‌متر مربع کیلوپاسکال بود. نفوذپذیری این فیلم با فیلم‌های تهیه‌شده از ژلاتین استخراج‌شده از پوست کپور علف‌خوار (*Cyprinus carpio*) و پوست ماهی تیلپایا مطابقت داشت [53, 54]. در واقع نفوذپذیری در فیلم‌های ژلاتینی مختلف می‌تواند ناشی از فقدان محتوای آمینواسیدهای هیدروفوبیک در آنها باشد که می‌توانند نقش سدکنندگی در برابر عبور بخار آب ایفا کنند. هر چه مقدار این آمینواسیدها بیشتر باشد خاصیت سدکنندگی فیلم در برابر بخار آب بیشتر است و نفوذپذیری کاهش خواهد یافت [53].

نتیجه‌گیری

ژلاتین استخراج شده از پوست تاس‌ماهی سیبری، دارای خواص خوبی از لحاظ بازده استخراج، قدرت تشکیل ژل، میزان پروتئین و درجه بلوم بود. فیلم حاصل از این ژلاتین نیز خواص مکانیکی و فیزیکی نسبتاً مناسب در مقایسه با مطالعات گذشته نشان داد. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی از این فیلم ساختاری صاف و بدون ترک‌خوردگی نشان داد و همچنین نتایج حاصل از FTIR گویای شکل‌گیری باندهای آمیدی در فیلم بود. بنابراین استفاده از زایدات تاس‌ماهی سیبری برای استخراج ژلاتین و تهیه فیلم‌های خوراکی و ترکیب آن با سایر ترکیبات دیگر و تشکیل کامپوزیت‌های زیست‌تخریب‌پذیر، قادر است دریچه جدیدی به صنعت بسته‌بندی و کاهش زایدات باز کند. اگرچه تحقیقات بیشتری در آینده به منظور بهبود تقویت این فیلم‌ها از لحاظ کاهش میزان حلالیت و نفوذپذیری نیاز است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از همکاری پرسنل محترم آزمایشگاه شیلات و علوم صنایع غذایی دانشگاه شیراز و همکاری مدیریت محترم مزرعه پرورش ماهیان خاویاری قره‌برون، شهر ساری، به دلیل فراهم کردن نمونه، تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: همه نویسندگان در انتشار مقاله حاضر اتفاق نظر دارند.
تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی بین نویسندگان این مطالعه وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا موسوی (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ صدیقه بابایی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ فرزانه وردیزاده (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ محمود ناصری (نویسنده چهارم)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت مالی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز اجرا شده است.

منابع

- 1- Gudmundsson M. Rheological properties of fish gelatins. J Food Sci. 2002;67(6):2172-6.
- 2- Muyonga JH, Cole CG, Duodu KG. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. Food Hydrocoll. 2004;18(4):581-92.
- 3- Karayannakidis PD, Zotos A. Fish processing by-products as a potential source of gelatin: A review. J Aquat Food Prod Technol. 2016;25(1):65-92.
- 4- Jamilah B, Harvinder KG. Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). Food Chem. 2002;77(1):81-4.
- 5- Tabarestani HS, Maghsoudlou Y, Motamedzadegan A, Sadeghi Mahoonak AR. Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Bioresour Technol. 2010;101(15):6207-14.
- 6- Sanaei AV, Mahmoodani F, See SF, Yusop SM, Babji AS. Optimization of gelatin extraction and physico-chemical properties of catfish (*Clarias gariepinus*) bone gelatin. Int

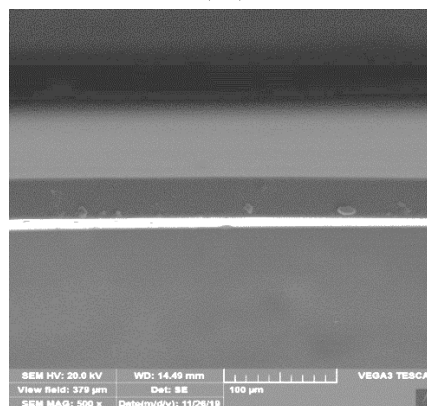
گروه‌های C-N و N-H محدوده آمیدی و ارتعاشات گروه CH_2 گلیسین مربوط است [61]. باندهای جذبی طیف محدوده آمیدی، در ناحیه‌ای مشابه فیلم‌های تولیدی از ژلاتین حاصل از پوست ماهی سوف نیل و پوست ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) بود [2, 62]. باند جذبی در ناحیه 1530 cm^{-1} مختص گروه‌های آمیدی است که در ساختار زنجیره بتا دخالت دارند. به علاوه باند جذبی قوی در ناحیه 1633 cm^{-1} مختص زنجیره آلفا است. از آنجایی که ژلاتین به وسیله دناتوره شدن مارپیچ سه‌گانه کلاژن حاصل می‌شود و همچنین با توجه به اینکه خواص مکانیکی ژل حاصل از ژلاتین تحت تاثیر مارپیچ سه‌گانه قرار می‌گیرد، می‌توان گفت که فیلم تولید شده در شرایط pH اسیدی، به دلیل فرآیند تخریبی کم، محتوی مارپیچ سه‌گانه (ساختار ثانویه پروتئین) بیشتری است، بنابراین باند جذبی قوی‌تری در ناحیه آمید I دارد و از خواص مکانیکی برتری برخوردار است [63].

آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به مقطع عرضی و سطح فیلم ژلاتین تاس‌ماهی سیبری، صاف و بدون هر گونه ترک‌خوردگی و منفذ است (شکل ۱). همچنین مقطع عرضی فیلم از ساختار یکنواخت و به هم فشرده‌ای برخوردار است. این نتیجه بیان‌کننده تشکیل ساختاری پیوسته و همچنین پیوند زنجیره‌های پلیمر ژلاتین تاس‌ماهی سیبری با همدیگر است.



(الف)



(ب)

شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به فیلم حاصل از ژلاتین تاس‌ماهی سیبری: (الف) سطح عرضی؛ (ب) سطح مقطع

quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem.* 2010;120(1):193-8.

24- Lee J, Bhattacharyya D, Eastal AJ, Metson JB. Properties of nano-ZnO/poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene oxide) composite thin films. *Curr Appl Phys.* 2008;8(1):42-7.

25- Sabbaghpour S, Motamedzadegan A, Mujtahedi M. Investigating the effects of preprocessing conditions on qualitative characteristics of skin gelatin of the Iranian Beluga. *Eur Online J Nat Soc Sci.* 2014;3(3):758-68.

26- Bower CK, Avena-Bustillos RJ, Olsen CW, McHugh TH, Bechtel PJ. Characterization of fish-skin gelatin gels and films containing the antimicrobial enzyme lysozyme. *J Food Sci.* 2006;71(5):M141-5.

27- Haddar A, Sellimi S, Ghannouchi R, Alvarez OM, Nasri M, Bougatef A. Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *Int J Biol Macromol.* 2012;51(4):477-83.

28- Silva EV, Lourenço LD, Pena RS. Optimization and characterization of gelatin from kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) skin. *CyTA J Food.* 2017;15(3):361-8.

29- Dinçer MT, Erdem ÖA, Kalkan H, Üçok MÇ. Comparison of recovered carp scales (*Cyprinus carpio*) gelatin and commercial calf and pork skin gelatins. *Ege J Fish Aquat Sci.* 2016;33(4):335-41.

30- Giménez B, Gomez-Guillen MC, Montero P. Storage of dried fish skins on quality characteristics of extracted gelatin. *Food Hydrocoll.* 2005;19(6):958-63.

31- Gudmundsson M, Hafsteinsson H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *J Food Sci.* 1997;62(1):37-9.

32- See SF, Hong PK, Ng KL, Wan Aida WM, Babji AS. Physicochemical properties of gelatins extracted from skins of different freshwater fish species. *Int Food Res J.* 2010;17(3):809-16.

33- Ninan G, Joseph J, Aliyamveetil ZA. A comparative study on the physical, chemical and functional properties of carp skin and mammalian gelatins. *J Food Sci Technol.* 2014;51(9):2085-91.

34- Burjanadze TV. Hydroxyproline content and location in relation to collagen thermal stability. *Biopolym Orig Res Biomol.* 1979;18(4):931-8.

35- Fernandez-Diaz MD, Montero P, Gómez-Guillén MC. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydrocoll.* 2003;17(3):281-6.

36- Cho SM, Gu YS, Kim SB. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll.* 2005;19(2):221-9.

37- Karim AA, Bhat R. Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll.* 2009;23(3):563-76.

38- Milovanovic I, Hayes M. Marine gelatine from rest raw materials. *Appl Sci.* 2018;8(12):2407.

39- Zhou P, Mulvaney SJ, Regenstien JM. Properties of Alaska pollock skin gelatin: A comparison with tilapia and pork skin gelatins. *J Food Sci.* 2006;71(6):C313-21.

40- Zhang Y, Regenstien JM. Yield and gel strength of gelatin extracted from smoked salmon (*Salmo salar*) skins. *J Aquat Food Prod Technol.* 2017;26(5):553-65.

41- Jamili Sh, Sadeghi H, Rezayat M, Kaymaram F, Attar H. Extraction and evaluation of gelatin from yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) skin and prospect as an alternative to mammalian gelatin. *Iran J Fish Sci.* 2019;18(4):903-14. [Persian]

Food Res J. 2013;20(1):423-30.

7- Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, De La Caba K. Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. *Food Hydrocoll.* 2017;68:192-8.

8- Boran G, Regenstien JM. Fish gelatin. In: Academic Press. *Advances in food and nutrition research.* 1st Edition. Cambridge: Academic Press; 2010. pp. 119-43.

9- Chiou BS, Avena-Bustillos RJ, Shey J, Yee E, Bechtel PJ, Imam SH, et al. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. *Polymer.* 2006;47(18):6379-86.

10- FAO. The state of world fisheries and aquaculture. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.

11- Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Prodpran T, Tanaka M. Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocoll.* 2006;20(4):492-501.

12- Waheed H. Development of edible films from gelatin extracted from Argentine shortfin squid "Illex Argentinus" with the use of an enzyme (pepsin) aided process [Dissertation]. Montreal: McGill University; 2016.

13- Hamlin HJ, Milnes MR, Beaulaton CM, Albergetti LC, Guillelte Jr LJ. Gonadal stage and sex steroid correlations in Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, habituated to a semitropical environment. *J World Aquac Soc.* 2011;42(3):313-20.

14- Gisbert E, Ruban GI. Ontogenetic behavior of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*: A synthesis between laboratory tests and field data. *Environ Biol Fish.* 2003;67(3):311-9.

15- FAO. Global partnership for climate, fisheries and aquaculture [Internet]. Rome: FAO; 2020 [cited 2020 May 8]. Available from: www.fao.org/pacfa/en/.

16- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 17th Edition. Gaithersburg: AOAC International; 2005.

17- Shyni K, Hema GS, Ninan G, Mathew S, Joshy CG, Lakshmanan PT. Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Food Hydrocoll.* 2014;39(6):68-76.

18- Rosseto M, Krein DD, Balbé NP, Dettmer A. Starch-gelatin film as an alternative to the use of plastics in agriculture: A review. *J Sci Food Agric.* 2019;99(15):6671-9.

19- Gómez-Guillén MC, Turnay J, Fernández-Diaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA, Montero P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocoll.* 2002;16(1):25-34.

20- Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. In: McNeil SE, editor. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery.* Totowa: Humana Press; 2011. pp. 63-70.

21- López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Pérez-Mateos M, Montero P. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocoll.* 2005;19(2):303-11.

22- Ballesteros LF, Cerqueira MA, Teixeira JA, Mussatto SI. Production and physicochemical properties of carboxymethyl cellulose films enriched with spent coffee grounds polysaccharides. *Int J Biol Macromol.* 2018;106(4):647-55.

23- Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SM. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the

- 53- Wang Y, Zhang R, Qin W, Dai J, Zhang Q, Lee K, et al. Physicochemical properties of gelatin films containing tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles generated by electrospray. *Mater Des.* 2020;185:108277.
- 54- Nilsuwan K, Guerrero P, De La Caba K, Benjakul S, Prodpran T. Properties and application of bilayer films based on poly (lactic acid) and fish gelatin containing epigallocatechin gallate fabricated by thermo-compression molding. *Food Hydrocoll.* 2020;105:105792.
- 55- Jiménez A, Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. Edible and biodegradable starch films: A review. *Food Bioprocess Technol.* 2012;5(6):2058-76.
- 56- Weng W, Zheng H, Su W. Characterization of edible films based on tilapia (*Tilapia zillii*) scale gelatin with different extraction pH. *Food Hydrocoll.* 2014;41(5):19-26.
- 57- Bae HJ, Park HJ, Hong SI, Byun YJ, Darby DO, Kimmel RM, et al. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. *LWT Food Sci Technol.* 2009;42(6):1179-86.
- 58- Guerrero P, Zugasti I, Etxabide A, Bao HN, Trang Si T, Peñalba M, et al. Effect of fructose and ascorbic acid on the performance of cross-linked fish gelatin films. *Polymers.* 2020;12(3):570.
- 59- Amir RM, Anjum FM, Khan MI, Khan MR, Pasha I, Nadeem M. Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. *J Food Sci Technol.* 2013;50(5):1018-23.
- 60- Aewsiri T, Benjakul S, Visessanguan W. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. *Food Chem.* 2009;115(1):243-9.
- 61- Hoque MS, Benjakul S, Prodpran T. Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *J Food Eng.* 2010;96(1):66-73.
- 62- Hoque MS, Benjakul S, Prodpran T. Effects of hydrogen peroxide and Fenton's reagent on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Food Chem.* 2011;128(4):878-88.
- 63- Prystupa DA, Donald AM. Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. *Polym Gels Netw.* 1996;4(2):87-110.
- 42- Intarasirisawat R, Benjakul S, Visessanguan W, Prodpran T, Tanaka M, Howell NK. Autolysis study of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin and its effect on gelatin. *Food Hydrocoll.* 2007;21(4):537-44.
- 43- Inagawa A, Fukuyama M, Hibara A, Harada M, Okada T. Zeta potential determination with a microchannel fabricated in solidified solvents. *J Coll Interface Sci.* 2018;532:231-5.
- 44- Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Controll Release.* 2005;109(1-3):256-74.
- 45- He Q, Zhang Y, Cai X, Wang Sh. Fabrication of gelatin-TiO₂ nanocomposite film and its structural, antibacterial and physical properties. *Int J Biol Macromol.* 2016;84(1):153-60.
- 46- Hanani ZN, Yee FC, Nor-Khaizura MA. Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Hydrocoll.* 2019;89(10):253-9.
- 47- Nilsuwan K, Benjakul S, Prodpran T. Quality changes of shrimp cracker covered with fish gelatin film without and with palm oil incorporated during storage. *Int Aquat Res.* 2016;8(3):227-38.
- 48- Abdollahi M, Alboofetileh M, Rezaei M, Behrooz R. Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocoll.* 2013;32(2):416-24.
- 49- Staroszczyk H, Kusznierewicz B, Malinowska-Pańczyk E, Sinkiewicz I, Gottfried K, Kołodziejaska I. Fish gelatin films containing aqueous extracts from phenolic-rich fruit pomace. *LWT Food Sci Technol.* 2020;117:108613.
- 50- Siripatrawan U, Harte BR. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocoll.* 2010;24(8):770-5.
- 51- Weng W, Zheng H. Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate. *Food Chem.* 2015;169(4):255-60.
- 52- Valizadeh Sh, Naseri M, Babaei S, Hosseini SM, Imani A. Development of bioactive composite films from chitosan and carboxymethyl cellulose using glutaraldehyde, cinnamon essential oil and oleic acid. *Int J Biol Macromol.* 2019;134:604-12.