

بهینه سازی شرایط استخراج پکتین به کمک امواج اولتراسونیک از تفاله

شاه توت (*Morus nigra L.*)

وحید مسیبی¹ - فریده طباطبایی یزدی^{2*}، زهرا امام جمعه³

تاریخ دریافت: 1394/07/17

تاریخ پذیرش: 1394/11/24

چکیده

در این پژوهش تکنیک استخراج به کمک امواج اولتراسوند (UAE) به منظور جداسازی پکتین از تفاله شاه توت به کار گرفته شد و از روش سطح پاسخ به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج استفاده شد. آزمایش‌ها در قالب طرح مرکب مرکزی با 3 متغیر مستقل هر یک در 3 سطح شامل نقاط فاکتوریل، محوری و مرکزی پایه‌ریزی شدند. متغیرهای مستقل فرآیند شامل زمان استخراج (60-20 دقیقه)، شدت صوت (40-100%) و نسبت حلال به نمونه (1:30-1:15 میلی‌لیتر بر گرم) بودند که تاثیر آنها بر روی راندمان استخراج، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، راندمان پکتین به صورت خطی تحت تاثیر شرایط استخراج قرار گرفت و با افزایش هر سه پارامتر مورد بررسی به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0/0001$). شرایط بهینه استخراج که با روش بهینه‌سازی عددی تعیین شد عبارت بودند از: مدت زمان 51/04 دقیقه، شدت اولتراسوند 100 درصد و نسبت حلال به نمونه 1:30 گرم بر میلی‌لیتر. تحت شرایط بهینه مقادیر راندمان، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین به ترتیب 7/39%، 56/11% و 25/46% پیش‌بینی شد که با آزمایشات تاییدی انجام شده اختلاف معنی‌داری بین مقادیر بدست آمده و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل مشاهده نشد. پکتین تفاله شاه توت در آزمایش رئولوژیک رفتار ویسکوالاستیک و رقیق‌شوندگی با برش از خود نشان داد و همچنین وزن مولکولی متوسط آن که براساس ویسکوزیته ذاتی تعیین شد، 50/03 kDa بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: تفاله شاه توت، پکتین، راندمان، محتوای گالاکتورونیک اسید، بهینه‌سازی

مقدمه

درجه استری شدن (DE) می‌نامند که نقش مهمی در خواص ژل‌کنندگی پکتین دارد. بسته به درجه استری شدن پکتین تجاری به دو گروه اصلی متوکسیل بالا ($DE > 50\%$) و متوکسیل پایین ($50\% < DE$) طبقه‌بندی می‌شود (Thakur *et al.*, 1997). در صنایع غذایی پکتین اصولاً به‌عنوان یک عامل ژله‌ای‌کننده شناخته شده است و کاربرد وسیعی در تولید مرباها و ژله‌ها، عصاره میوه‌ها، شیرینی‌ها و پرکننده‌های نانوائی دارد. کاربرد عمده دیگر پکتین، برای پایدارسازی محصولات شیری اسیدی شده و دوغ است (Willats *et al.*, 2006). امروزه در مقیاس صنعتی عمدتاً از پوست مرکبات یا گوشت سیب برای تولید پکتین استفاده می‌شود که هر دو فرآورده‌های جانبی تولید عصاره از این میوه‌ها هستند (Kumar Shaha *et al.*, 2013). تقاضای فزاینده صنعت به پکتین‌هایی با قابلیت‌های مختلف در ژله‌ای کردن یا پایدارسازی محصولات، نیاز به پکتین‌های متفاوت یا مشتقات متناسب آن را افزایش داده است (Rosenbohm *et al.*, 2003).

در فرآیند تولید عصاره از میوه‌های خانواده توت، مقادیر زیادی باقیمانده پرس (تفاله) به‌عنوان محصول جانبی تولید می‌شود که

پکتین هتروپلی‌ساکاریدی است که در دیواره سلولی نخستین گیاهان و در بخش لاملای میانی یافت می‌شود و نقش مهمی را به‌عنوان ماده سیمانی ایفا می‌کند. پکتین عمدتاً از واحدهای دی گالاکتورونیک اسید تشکیل شده است که با پیوندهای گلیکوزیدی $\alpha\text{-}1 \rightarrow 4$ به هم متصل شده و تشکیل یک زنجیره خطی می‌دهند، که به این زنجیره خطی زنجیره‌های جانبی قندهای خنثی دیگری مانند ال-رامنوز، ال-آرابینوز و دی-گالاکتوز متصل شده است (Liu *et al.*, 2010). برخی از گروه‌های کربوکسیلی واحدهای گالاکتورونیک اسید ممکن است با متانول استری شده باشند. نسبت گروه‌های کربوکسیلی استری شده به کل گروه‌های کربوکسیلی را

1 و 2- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
3-استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
(* - نویسنده مسئول (Email: tabatabai@um.ac.ir)

استخراج به کمک اولتراسوند به طور گسترده‌ای برای استخراج ترکیبات مختلف از بافت‌های گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته و به کار برده شده است، با این حال تمرکز تعداد کمی از این مطالعات منتشر شده بر استخراج پکتین بوده است (Panchev *et al.*, 1988; Bagherian *et al.*, 2011; Minjares-Fuentes *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). این محققان افزایش راندمان پکتین و نیز کاهش زمان استخراج را به عنوان مزیت اصلی این روش در مقایسه با روش مرسوم استخراج ذکر کرده‌اند. برای نمونه (Wang *et al.*, 2015) گزارش کردند که استخراج به کمک اولتراسوند در مقایسه با روش مرسوم، راندمان پکتین استحصال شده از پوست گریپ فروت را به میزان 16/34% افزایش و درجه حرارت و زمان استخراج را به ترتیب $13/3^{\circ}\text{C}$ و 37/78% کاهش داد. با این وجود، پکتین استخراج شده با این روش ویسکوزیته، وزن مولکولی و درجه استری شدن کمتر اما خلوص و درجه انشعاب بیشتری را در مقایسه با روش مرسوم نشان داد.

اخیرا Chen و همکاران (2015) نیز از روش سطح پاسخ (RSM) برای بهینه‌سازی استخراج پلی‌ساکاریدهای خام (کل پلی‌ساکاریدهای استخراج شده و رسوب داده شده با الکل) به کمک اولتراسوند از پودر میوه شاه‌توت استفاده کرده‌اند. لیکن این محققان تاثیر شرایط استخراج را بر روی درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید بررسی نکردند و بهینه‌سازی را تنها براساس یک متغیر وابسته (راندمان) انجام دادند. لذا در این پژوهش برآن شدیم تا تاثیر شرایط استخراج به کمک امواج اولتراسوند (یعنی زمان استخراج، شدت صوت، و نسبت حلال به نمونه) را بر روی راندمان، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین استحصال شده از تفاله شاه‌توت ارزیابی و بهینه‌سازی کنیم. برای این منظور از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی (CCD) برای برازش دادن و بهره‌برداری از یک مدل ریاضیاتی که بتواند رابطه بین متغیرها و هر پاسخ را به خوبی نمایش دهد، استفاده شد. در کنار این، وزن مولکولی متوسط و خواص رئولوژیک نمونه‌ای از پکتین‌های استخراج شده نیز اندازه‌گیری و مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پودر تفاله شاه‌توت

20 کیلوگرم میوه تازه شاه‌توت در فصل تابستان از یک بازار محلی میوه در کرج خریداری شد. میوه‌ها بلافاصله با استفاده از یک آبمیوه‌گیر پرسی دستی عصاره‌گیری شدند. تفاله (باقیمانده پرس) که گوشت و دانه میوه را شامل می‌شد مجدداً از یک صافی پارچه‌ای دولایه عبور داده شد تا حد امکان آب شاه‌توت بیشتری از آن جدا شود. تفاله تری که به این طریق بدست آمد در ظروف پلاستیکی

حاوی چندین ماده مغذی، اجزاء سازنده و ترکیبات با ارزش است (Landbo & Meyer, 2001, Hilz *et al.*, 2005). اگرچه میزان پکتین این تفاله‌ها در مقایسه با دیگر میوه‌های غنی از پکتین تا حدودی کمتر است ولی با این وجود برای استخراج پکتین مناسب هستند (Belafi-Bako *et al.*, 2012). شاه‌توت (*Morus nigra*, L) میوه‌ای است که به صورت عمده برای تولید مارمالاد، آب و نوشیدنی الکلی شاه‌توت، رنگ‌های طبیعی و نیز به صورت میوه منجمد در بستنی‌سازی استفاده می‌شود (حجت پناه و همکاران، 2011). میوه تازه شاه‌توت به خاطر ساختار ظریف، حساسیت نسبت به فساد و پایداری کم آن در شرایط انبارمانی (2 ماه در شرایط محیطی و پس از آن حداکثر تا 6 هفته در یخچال، حجت پناه و همکاران، 2011)، به ندرت تجاری‌سازی شده و به همین دلیل معمولاً به ژله یا آب شاه‌توت فرآوری می‌شود (Perez-Gregorio *et al.*, 2011).

در فرآیند مرسوم استخراج در مقیاس صنعتی، پکتین با آب داغ ($60-100^{\circ}\text{C}$) اسیدی شده با یک اسید معدنی (مانند سولفوریک، فسفریک، نیتریک، هیدروکلریک، و یا سیتریک اسید) که pH آن به 3-3/1 رسانده شده است در مدت 0/5 تا 6 ساعت استخراج می‌شود. به دلیل زمان نسبتاً طولانی حرارت‌دهی در این روش، پکتین استخراج شده دستخوش تخریب حرارتی می‌شود که این خود می‌تواند منجر به تغییرات نامطلوب در خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی آن شود (Koubala *et al.*, 2008)، لذا روش مرسوم استخراج چه از لحاظ کمیت و چه کیفیت پکتین حاصل مطلوب نیست (Liu *et al.*, 2006). اخیراً تعدادی از روش‌های جدید استخراج از جمله استخراج به کمک اولتراسوند (UAE)، استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE)، استخراج به کمک مایکروویو (MAE) و استخراج تسریع شده با حلال (ASE) به عنوان تکنیک‌های سازگارتر با محیط زیست و کارآمدتر برای افزایش بازبافت ترکیبات با ارزش از بافت‌های گیاهی، توسعه داده شده‌اند (Prakash Maran & Prya, 2015). استخراج به کمک اولتراسوند فرآیندی است که در آن از امواج صوتی با فرکانس بالاتر از 20 کیلوهرتز و حلال‌ها برای استخراج ترکیبات هدف از بافت‌های گیاهی مختلف استفاده می‌شود. اثرات مفید استخراج با این روش به کاویتاسیون صوتی نسبت داده شده است که با شکستن دیواره‌های سلولی باعث نفوذ بیشتر حلال به درون بافت گیاهی و متعاقباً آزادسازی محتویات درون سلول به بیرون (حلال استخراج‌کننده) می‌شود (Toma *et al.*, 2001). از آنجاییکه استخراج به کمک اولتراسوند مصرف انرژی و حلال کمتری دارد و راندمان استخراج بیشتر و سطح خودکارسازی بالاتری را ایجاد می‌کند، لذا نسبت به روش مرسوم استخراج با حلال قابل ترجیح است (Ying *et al.*, 2011). علاوه بر این به دلیل آنکه استخراج با این روش در درجه حرارت پایین‌تری انجام می‌شود لذا برای ترکیبات ناپایدار در مقابل دما مناسب‌تر است (Wu *et al.*, 2001). علارغم آنکه روش

پکتین از یک الک آزمایشگاهی با مش 80 عبور داده شد و برای انجام آزمایشات بعدی در یخچال (4 °C) نگهداری شد. راندمان پکتین (PY) از فرمول شماره 1 محاسبه شد (Maran et al., 2014b):

$$PY (\%) = \left(\frac{m_0}{m} \right) \times 100 \quad (1)$$

که در آن m_0 وزن پکتین خشک نهایی (گرم) و m وزن پودر تفاله شاه‌توت خشک شده (گرم) پس از کسر رطوبت می‌باشد.

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش گرید آزمایشگاهی بودند که از شرکت مرک (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) خریداری شدند. دو معرف متاهیدروکسی دی فنیل (3-فنیل فنول) و دی گالاتورونیک اسید تک آبه ($\geq 97\%$) خلوص) نیز از شرکت سیگما آلدريج (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) خریداری شدند. همچنین اتانول 96% از شرکت جهان شیمی (تهران) خریداری شد.

آنالیز شیمیایی پکتین

درجه استری شدن (DE)

اندازه‌گیری درجه استری شدن پکتین بر اساس روش پتانسیومتری Bocek و همکاران (2001) انجام شد. 0/2 گرم از نمونه پودر پکتین در داخل یک ارلن با 2/5 میلی‌لیتر اتانول 96% خیسانده شد. 20 میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه 40°C به آن اضافه و به مدت 2 ساعت بر روی همزن مغناطیسی هم‌زده شد تا پکتین کاملاً حل شود و کلوخه‌ای از آن باقی نماند. سپس با سود 0/1 نرمال در حضور معرف فنل فتالین تا ظهور رنگ صورتی کم‌رنگ تیتراژ شد و حجم سود مصرف شده به‌عنوان تیتراژ خنثی شدن (V_1) یادداشت شد. به محلول پلی‌گالاتورونیک اسید خنثی شده در مرحله اول تیتراژیون، 10 میلی‌لیتر سود 0/1 نرمال اضافه و ارلن درپوش گذاری شد و محتویات آن به مدت 2 ساعت دیگر به آرامی هم‌زده شد تا گروه‌های استری شده پکتین صابونی شود. 10 میلی‌لیتر اسید کلریدریک اضافه شد و اسید اضافی مجدداً با سود 0/1 نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم‌رنگ تیتراژ شد و حجم مصرفی تحت عنوان تیتراژ صابونی شدن (V_2) یادداشت شد. درجه استری شدن پکتین از رابطه زیر محاسبه شد (معادله 2):

$$DE (\%) = [V_2 / (V_1 + V_2)] \times 100 \quad (2)$$

محتوای گالاتورونیک اسید

محتوای گالاتورونیک اسید پکتین با روش رنگ‌سنجی با معرف متاهیدروکسی دی فنیل اکتباس شده از روش Ibarz و همکاران

پلی‌اتیلنی پر و تا زمان خشک کردن در فریزر در دمای 18°C - نگهداری شد. در مرحله بعد تفاله از حالت انجماد خارج شده و در یک آون تحت خلاء (Townson & Mercer Croydon, England) در درجه حرارت 50°C و مدت 4-6 ساعت به‌صورت لایه‌های نازک خشک شد. تفاله خشک شده با استفاده از یک خردکن آزمایشگاهی خرد شد تا به‌صورت پودر درآید و عملیات استخراج بر روی آن در مرحله بعد به‌صورت موثرتری انجام شود. ذرات پودر شده تفاله در ظروف پلی‌اتیلنی پر و تا زمان استخراج پکتین در یخچال (4°C) نگهداری شد. محتوای رطوبت پودر تفاله براساس روش Imran و همکاران (2010) اندازه‌گیری شد که مقدار آن به‌طور متوسط 7/8 درصد بدست آمد.

استخراج و جداسازی پکتین

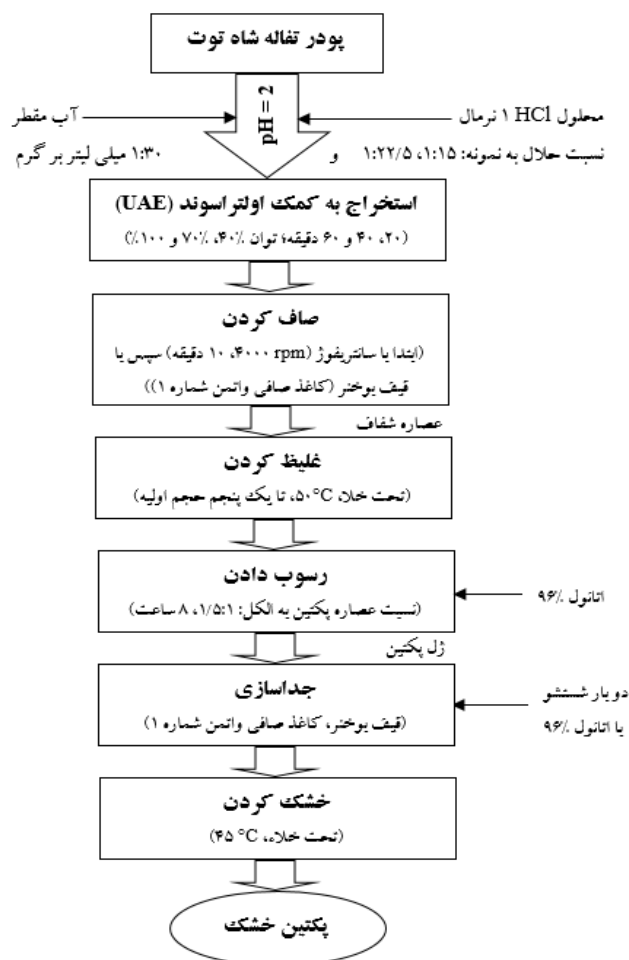
استخراج و جداسازی پکتین بر طبق روش باقریان و همکاران (2011) با یکسری تغییرات انجام شد که مراحل آن به‌صورت شماتیک در شکل شماره 1 نشان داده شده است. 40 گرم پودر تفاله شاه‌توت در یک ارلن با نسبت‌های 15:1، 20:1 و 30:1 (گرم بر میلی‌لیتر) با آب مقطر دیونیزه مخلوط شد. pH مخلوط با محلول 1 نرمال هیدروکلریک اسید بر روی عدد ثابت 2 تنظیم شد. فرآیند استخراج در یک حمام اولتراسونیک هیت‌ردار (Elma TI-H-10) محتوی آب مقطر و در ترکیب‌های مختلف زمان (20، 40 و 60 دقیقه)، و شدت صوت (40، 70، و 80%) مطابق با جدول شماره 2 انجام گرفت. فرکانس، توان اسمی و درجه حرارت آب حمام اولتراسونیک در تمام تیمارهای استخراجی یکسان و به ترتیب 35 کیلو هرتز، 800 W و 65-68°C بود. عصاره استخراج شده سرد شد تا به دمای محیط برسد و در مرحله بعد ابتدا توسط سانتریفوژ (Universal 320، Hettich، Germany) (4000rpm، 10 دقیقه) و سپس با کمک قیف بوختر (کاغذ صافی واتمن شماره 1) صاف شد. عصاره صاف شده در یک تبخیر کننده چرخشی (RV-10، IKA، Germany) و تحت شرایط خلاء (50°C) تا یک پنجم حجم اولیه غلیظ شد. سپس pH عصاره غلیظ شده با محلول سود 2 نرمال به 3/5 (pH حداکثر رسوب پکتین) رسانده شد و به نسبت حجمی 1 به 1/5 (1 قسمت عصاره و 1/5 قسمت اتانول 96%) با اتانول 96% مخلوط شد و به مدت 8 ساعت در درجه حرارت محیط باقی ماند تا پکتین رسوب کند. پکتین رسوب کرده 2 بار با اتانول 96% تازه شستشو داده شد تا مونوساکاریدها و دی ساکاریدها از آن جدا شود (Maran et al., 2013)، سپس با کمک قیف بوختر (کاغذ صافی واتمن شماره 1) از ناخالصی‌ها جداسازی شد. پکتین تر بدست آمده تحت شرایط خلاء (45°C) تا رسیدن به وزن ثابت خشک و سپس با یک آسیاب آزمایشگاهی آسیاب شد تا به‌صورت پودر درآید. پودر

اندازه گیری جذب محلول های گالاکتورونیک اسید در محدوده غلظت 100-20 میکروگرم بر میلی لیتر در 520 نانومتر تهیه شد. برای هر نمونه پکتین یک نمونه شاهد نیز که بدون گالاکتورونیک اسید بود آماده سازی و جذب آن از جذب نمونه اصلی کسر شد. غلظت گالاکتورونیک اسید نمونه های پکتین با استفاده از معادله رگرسیون خطی منحنی کالیبراسیون و بر پایه وزن خشک پکتین محاسبه شد (معادله 3).

$$Y = 0.012x - 0.109 \quad R^2 = 0.999 \quad (3)$$

در این معادله Y مقدار جذب و x غلظت گالاکتورونیک اسید بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر است.

(2006) اندازه گیری شد. 1 میلی لیتر از محلول آبی 0/02% وزنی/حجمی پکتین با 6 میلی لیتر از محلول 12/5 میلی مولار تترابورات سدیم در اسید سولفوریک غلیظ (95-98%) در یک لوله آزمایش شیشه ای مخلوط شد. مخلوط در حمام آب جوش 100 °C دقیقاً به مدت 6 دقیقه حرارت دهی شد و سپس در حمام آب یخ سریعاً خنک شد. 0/1 میلی لیتر (100 میکرولیتر) از معرف متاهیدروکسی دی فنیل 0/15% وزنی/حجمی در 0/125 مولار سدیم هیدروکسید به محتویات لوله آزمایش اضافه شد و جذب آن پس از گذشت 15 دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش - مرئی (Cecil CE2502) در 520 نانومتر اندازه گیری شد. یک منحنی استاندارد جذب/غلظت با



شکل 1- مراحل استخراج و جداسازی پکتین

حاوی 5 میلی مولار ادتات سدیم، 0/155 مولار سدیم کلرید و 0/04 درصد سدیم آزید (به عنوان نگهدارنده) آماده سازی شد. محلول های پکتین با صافی غشایی 0/45 میکرون صاف شد و زمان جریان آنها با استفاده از ویسکومتر لوله موین Cannon-Fenske شماره

ویسکوزیته ذاتی (η_{sp}) و وزن مولکولی متوسط (M_v) ویسکوزیته ذاتی نمونه ای از پکتین استخراج شده از تفاله شاه توت (تیماز نقطه مرکزی) بر اساس روش Pagan و همکاران (2010) تعیین شد. غلظت های 0/1، 0/2، 0/3 و 0/4 از پکتین در محلول آبی

(2009). در این پژوهش طرح مرکب مرکزی وجوه پر² با سه متغیر مستقل هر یک در 3 سطح و 6 تکرار در نقطه مرکزی (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) به منظور بررسی و بهینه‌سازی اثرات متغیرهای مستقل زمان استخراج، شدت صوت و نسبت حلال به نمونه بر روی راندمان، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین به کار گرفته شد. سطوح متغیرهای مستقل فرآیند در جدول شماره 1 نشان داده شده است. کفایت مدل‌های برازش شده برای هر پاسخ با استفاده از: آزمایش فیشر (F-test)، ضریب تغییرات (CV)، نمودار مقادیر مشاهده شده در مقابل مقادیر پیش‌بینی شده، آزمایش عدم برازش³، و ضریب تغییرات در سطح 5% معناداری ارزیابی شد. به منظور طراحی آزمایشات، تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم‌افزار Design expert (نسخه 8.0.7.1 trial) استفاده گردید.

نتایج و بحث

20 تیمار استخراجی مطابق شرایط تعیین شده در طرح RSM انجام گرفت. جدول 2 شرایط هر تیمار استخراجی و نیز مقادیر بدست آمده برای راندمان، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید را در استخراج پکتین به کمک امواج اولتراسوند از تناله شاه‌توت نشان می‌دهد.

گزینش مدل مناسب

داده‌های آزمایشی بدست آمده برای راندمان، DE و GalA پکتین به مدل‌های مختلفی (خطی، متقابل (2FI)، درجه دوم و درجه سوم) برازش شدند، سپس این مدل‌ها با کمک تجزیه و تحلیل رگرسیون و تجزیه واریانس (ANOVA) ارزیابی شدند تا مدل تجربی مناسب انتخاب شود. بر این اساس نرم‌افزار Design Expert مدل خطی را مدل مناسب برای راندمان و مدل چند جمله‌ای درجه دوم را به‌عنوان مدل مناسب برای DE و GalA پکتین انتخاب کرد. معنی‌داری آماری مدل‌های انتخاب شده و نیز هر کدام از ضرایب رگرسیونی مدل‌ها با آنالیز واریانس بررسی شد (جدول 3 و 4). هرچه مقدار F بزرگتر و مقدار p مربوطه کوچکتر شود مدل معنی‌دارتر خواهد بود (Atkinson & Doney, 1992). بر این اساس مقدار بالای F (156/73) و مقدار پایین‌تر p مربوطه ($p < 0/0001$) نشان می‌دهد که مدل خطی به‌خوبی به داده‌های آزمایشی مربوط به راندمان پکتین برازش شده است. همچنین مدل‌های درجه دوم برازش شده برای DE و GalA پکتین نیز معنی‌دار شدند ($p < 0/05$). کفایت مدل‌های

518/10 (Schott-Geräte, Hofheim, Germany) اندازه‌گیری شد. درجه حرارت محلول با غوطه‌ور کردن ویسکومتر در یک حمام آب با دمای کنترل شده در 25 °C ثابت نگه داشته شد. ویسکوزیته ذاتی ($[\eta]$) پکتین از طریق ترسیم نمودار غلظت پکتین (بر حسب g/100 mL) در محور افقی در برابر لگاریتم طبیعی ویسکوزیته نسبی تقسیم بر غلظت (معادله Kraemer) و ویسکوزیته ویژه تقسیم بر غلظت (معادله Huggins) در محور عمودی برآورد شد.

$$(\ln \eta_{rel})/C = [\eta] + K'[\eta]^2 \quad (\text{Kraemer}) \quad (4)$$

$$(\eta_{sp}/C) = [\eta] + K''[\eta]^2 C \quad (\text{Huggins}) \quad (5)$$

میانگین نقطه تلاقی این دو نمودار با محور عمودی به‌عنوان ویسکوزیته ذاتی پکتین برحسب واحد دسی‌لیتر بر گرم قلمداد شد (Iglesias & Lozano, 2004). در نهایت وزن مولکولی متوسط (M_v) پکتین از معادله Mark-Houwink-Sakurada ($[\eta] = KM_v^a$) که در آن K و a اعداد ثابتی هستند که هر دو به دما و مشخصات حل‌شونده و حلال وابسته هستند (Migliori et al., 2010). در این پژوهش مقادیر K و a به ترتیب برابر با 0/09550 و 0/73 در نظر گرفته شد (Anger & Berth, 1986).

خواص رئولوژیک

خصوصیات رئولوژیک پکتین بوسیله دستگاه رئومتر تنش کنترل شده (Anton Paar, Physica MCR 300) و پروب با هندسه استوانه متحدالمرکز (شعاع خارجی 14/46 mm، شکاف: 1/13 mm) ارزیابی شد. محلول پکتین با حل کردن آن در آب مقطر تهیه شد (0/5% و 1/5% وزنی/حجمی). آزمون نوسانی دینامیک برای اندازه‌گیری مدول‌های الاستیک (G') و ویسکوز (G'') محلول‌های پکتین به کار رفت. ابتدا آزمون روبش کرنش (100-0/01%) در 1 هرتز بر روی نمونه انجام شد تا محدوده ویسکو الاستیک خطی¹ مشخص شود. سپس وابستگی مدول‌های G' و G'' به فرکانس با آزمون روبش فرکانس (100-0/01 هرتز در کرنش 1%) تعیین شد. نمودار رئولوژیکی نیز با کمک نرم‌افزار Origin نسخه 8,6,0 رسم شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح Box-Wilson که طرح مرکب مرکزی نیز نامیده می‌شود، یک طرح آزمایشی است که برای دستیابی به حداکثر اطلاعات درباره یک فرآیند با حداقل تعداد آزمایشات به کار می‌رود (Yang et al.,

برای هر سه پاسخ، معنی دار نبود که نشان می‌دهد این مدلها برای پیش‌گویی پاسخ‌های مربوطه به اندازه کافی دقیق هستند.

گزینش شده علاوه بر این با استفاده از ضریب تبیین (R^2)، ضریب تبیین اصلاح شده ($Adj-R^2$) و نیز آزمون عدم برازش و ضریب تغییرات نیز بررسی شد. مطابق نتایج ANOVA آزمون عدم برازش

جدول 1- متغیرهای مستقل فرآیند و سطوح آنها

سطوح هر متغیر			متغیرهای مستقل
1+ (بالا)	0 (مرکزی)	1- (پایین)	
60	40	20	X_1 : زمان استخراج (دقیقه)
100	70	40	X_2 : شدت صوت (%)
30	22/5	15	X_3 : نسبت حلال به نمونه (میلی لیتر بر گرم)

جدول 2- طرح مکعب مرکزی وجوه پر (FCCCD) و مقادیر پاسخ‌های بدست آمده در استخراج پکتین به کمک امواج اولتراسونیک

تیمار	زمان استخراج (دقیقه)	شدت صوت (%)	نسبت حلال به نمونه (میلی لیتر بر گرم)	راندمان پکتین (%)	درجه استری شدن (%)	محتوای گالاکتورونیک اسید (%)
1	20	40	30	5/55	45/82	18/70
2	60	40	30	5/93	58/33	24/08
3	20	100	30	6/71	53/57	21/17
4	60	100	30	7/68	51/51	26/42
5	20	40	15	4/73	42/42	31/45
6	60	40	15	5/53	51/29	25/63
7	20	100	15	6/10	52/54	21/71
8	60	100	15	7/01	42/85	22/42
9	20	70	22/5	5/77	44/82	25/46
10	60	70	22/5	6/61	45/16	27/17
11	40	40	22/5	5/42	51/39	29/25
12	40	100	22/5	6/83	53/57	24/87
13	40	70	30	6/51	56/52	21/87
14	40	70	15	5/88	51/85	25/25
15	40	70	22/5	5/99	56/66	25/92
16	40	70	22/5	6/35	57/14	25/74
17	40	70	22/5	6/02	55/55	26/52
18	40	70	22/5	6/17	50/00	25/45
19	40	70	22/5	6/23	51/85	23/62
20	40	70	22/5	5/92	55/32	25/21

تبیین منفی (0/0517-) برای GalA نشان می‌دهد که میانگین کلی نسبت به مدل چند جمله‌ای درجه دوم پیشنهاد شده پیشگوی بهتری برای پاسخ (GalA) است. با توجه به جدول 5، مقدار کم ضریب تغییرات (کمتر از 10%) برای هر سه پاسخ نشان می‌دهد که داده‌های آزمایشی بدست آمده از تکرارپذیری و قابلیت اطمینان بالایی برخوردار است. در این پژوهش مقدار دقت مناسب برای هر سه مدل برازش شده بیشتر از 4 بدست آمد که نشان می‌دهد می‌توان از مدل‌های

مقادیر شاخص‌های آماری مربوط به مدل برازش شده به هر یک از پاسخ‌ها در جدول 5 نشان داده شده است. مقادیر بالای ضریب تبیین (0/9671)، ضریب تبیین اصلاح شده (0/9609) و ضریب تبیین پیش‌بینی شده (0/9460) برای راندمان پکتین به وضوح بیانگر این است که مدل رگرسیونی خطی انتخاب شده برای نشان دادن رابطه واقعی بین پاسخ (راندمان) و متغیرهای مستقل از همبستگی بالایی برخوردار است (Prakash Maran et al., 2013). مقدار ضریب

نرم افزار Design Expert معادله‌های رگرسیونی خطی و چند جمله‌ای درجه دوم زیر را برای توصیف رابطه بین متغیرهای مستقل فرایند و پاسخ‌ها تولید کرد:

$$PY = 6.15 + 0.39X_1 + 0.72X_2 - 0.31X_3 \quad (6)$$

$$DE = +53.41 + 1.00X_1 + 0.48X_2 - 2.48X_3 - 4.14X_1X_2 - 1.41X_1X_3 + 0.094X_2X_3 - 6.89X_1^2 + 0.60X_2^2 + 2.30X_3^2 \quad (7)$$

$$GA = +25.73 + 0.72X_1 - 1.25X_2 + 1.42X_3 + 0.80X_1X_2 - 1.97X_1X_3 - 2.224X_2X_3 + 0.12X_1^2 + 0.86X_2^2 - 2.64X_3^2 \quad (8)$$

که در این معادلات PY، DE و GA به ترتیب مقادیر راندمان پکتین، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید برحسب درصد می‌باشد. X_1 ، X_2 و X_3 نیز به ترتیب مقادیر کدگذاری شده زمان استخراج، شدت صوت و نسبت حلال به نمونه می‌باشد.

برازش شده در محدوده آزمایشی استفاده کرد (Minjares-Fuentes *et al.*, 2014). نتایج ANOVA (جدول 3) نشان داد که اثر هر سه پارامتر مورد بررسی بر روی راندمان پکتین معنی‌دار است ($p < 0/0001$) و شدت صوت (X_2) بیشترین تاثیر معنی‌دار را بر روی راندمان پکتین نشان داد. در ارتباط با DE (جدول 4)، در بین اثرات خطی، فقط اثر خطی نسبت حلال به نمونه (X_3) بر روی DE پکتین معنی‌دار شد ($p < 0/0001$). نیز عبارت‌های معنی‌دار مدل بودند که بر روی DE تاثیر گذاشتند ($p < 0/05$). اثر خطی شدت صوت (X_2)، اثرات خطی و درجه دوم نسبت حلال به نمونه (X_3) و X_3^2 و اثرات متقابل بین زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه (X_1X_3) و بین شدت صوت و نسبت حلال به نمونه (X_2X_3) نیز عبارت‌های معنی‌دار موثر بر محتوای Gala پکتین بودند ($p < 0/05$).
با به کارگیری آنالیز رگرسیونی بر روی داده‌های آزمایشگاهی،

جدول 3- نتایج آنالیز واریانس مدل خطی برای راندمان پکتین

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار p
مدل	7/64	3	2/55	156/73	<0/0001
X_1 - زمان استخراج	1/52	1	1/52	93/59	<0/0001
X_2 - شدت صوت	5/14	1	5/14	316/31	<0/0001
X_3 - نسبت حلال به نمونه	0/98	1	0/98	60/28	<0/0001
باقیمانده	0/26	16	0/021		
عدم برازش	0/13	11	0/011	0/43	0/8889
خطای خالص	0/13	5	0/027		
کل	7/90	19			

جدول 4- نتایج آنالیز واریانس و ضرایب رگرسیونی مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید

منبع	درجه آزادی	درجه استری شدن			محتوای گالاکتورونیک اسید	
		ضرایب رگرسیون	مجموع مربعات	عدد p	ضرایب رگرسیون	مجموع مربعات
مدل	9	27/7170	381/10	0/0039	43/9607	140/33
X_1	1	1/7003	9/94	0/2497	-0/3757	5/23
X_2	1	0/2086	2/29	0/5702	-0/4511	15/68
X_3	1	-1/8573	61/50	0/0125	0/7056	20/22
X_1X_2	1	-0/0069	137/20	0/0011	0/0013	5/12
X_1X_3	1	0/0094	15/88	0/1535	0/0131	30/97
X_2X_3	1	-0/0004	0/070	0/9202	0/0099	39/43
X_1^2	1	-0/0172	130/67	0/0013	0/0003	0/038
X_2^2	1	0/0007	0/98	0/7093	0/0010	2/04
X_3^2	1	0/0409	14/57	0/1698	-0/0469	19/14
باقیمانده	10		66/57			14/86
عدم برازش	5		25/92	0/6832		10/02
خطای خالص	5		40/64			4/85
کل	19		447/66			155/20

جدول 5- شاخص‌های آماری مدل‌های برازش یافته برای هر پاسخ

پاسخ	R ²	R ² _{adjusted}	R ² _{predicted}	Adequate precision	SD	Mean	CV	PRESS
راندمان	0/9671	0/9609	0/9460	49/813	0/13	6/15	2/07	0/43
DE	0/851	0/718	0/535	8/53	2/58	51/41	5/02	208/38
GalA	0/904	0/818	-0/052	13/014	1/22	24/90	4/90	163/22

شدت صوت از 40 تا 100% در زمان و نسبت نمونه به حلال ثابت به ترتیب 40 دقیقه و 22/5 میلی‌لیتر بر گرم، راندمان پکتین به‌طور متوسط 26% افزایش پیدا کرد. بر طبق Xu و همکاران (2014)(2014)، با افزایش دامنه یا توان فراصوت، فروپاشی حباب کایتاسیونی نیز شدیدتر می‌شود، زیرا اندازه حباب تشدیدشده متناسب با دامنه امواج اولتراسونیک است. متعاقباً شدت کایتاسیون و فشار قویتر نیز باعث پاره شدن بیشتر دیواره سلولی و افزایش انتقال جرم می‌شود (Chen et al., 2015).

نسبت حلال به نمونه (LS ratio) پارامتر مهمی است که به‌صورت چشمگیری بر راندمان استخراج پکتین اثر می‌گذارد. Xu و همکاران (2014) Prakash Maran & Priya, (2014) و Moorthy و همکاران (2014) نیز در استخراج پکتین به کمک امواج اولتراسوند گزارش دادند که افزایش نسبت حلال به نمونه به‌ترتیب از 1:30 تا 1:50، از 1:20 تا 1:30 و از 1:10 تا 1:15 میلی‌لیتر بر گرم باعث افزایش معنی‌دار و سریع در راندمان پکتین شد، در حالیکه افزایش آن به بیشتر از مقادیر ذکر شده نه تنها تغییری در راندمان پکتین ایجاد نکرد بلکه برعکس باعث کاهش راندمان نیز شد. هرچه نسبت حلال به نمونه کمتر باشد غلظت و ویسکوزیته حلال استخراج‌کننده نیز بیشتر خواهد بود. شدت کایتاسیون نیز با افزایش ویسکوزیته محیط کم می‌شود، زیرا شکل‌گیری کایتاسیون نیازمند آن است که فشار منفی در منطقه رقیق تابع موج بر نیروهای چسبندگی طبیعی غلبه کند. از اینرو ایجاد کایتاسیون در مایعات گرانبه‌تر که نیروهای چسبندگی قویتری دارند مشکل‌تر است (Majumdar et al., 1998; Gogate & Pandit., 2004). از سوی دیگر با افزایش نسبت حلال به نمونه متوسط شدت فراصوت اعمال شده بر بافت گیاهی در اثر تکه‌تکه شدن آن (بافت گیاهی) بیشتر می‌شود. با این حال در نسبت‌های حلال به نمونه خیلی بالا نرخ تخریب مولکول‌های پلیمر به دلیل غلظت کم آنها بیشتر شده و از این‌رو راندمان پکتین کاهش می‌یابد (Xu et al., 2014).

تاثیر شرایط استخراج بر روی درجه استری شدن پکتین

شرایط مختلف استخراج می‌تواند منجر به ایجاد تغییراتی در ساختار و خصوصیات پکتین شود. شکل 3 اثر شرایط استخراج به کمک اولتراسوند را بر روی DE پکتین نشان می‌دهد. همانطور که

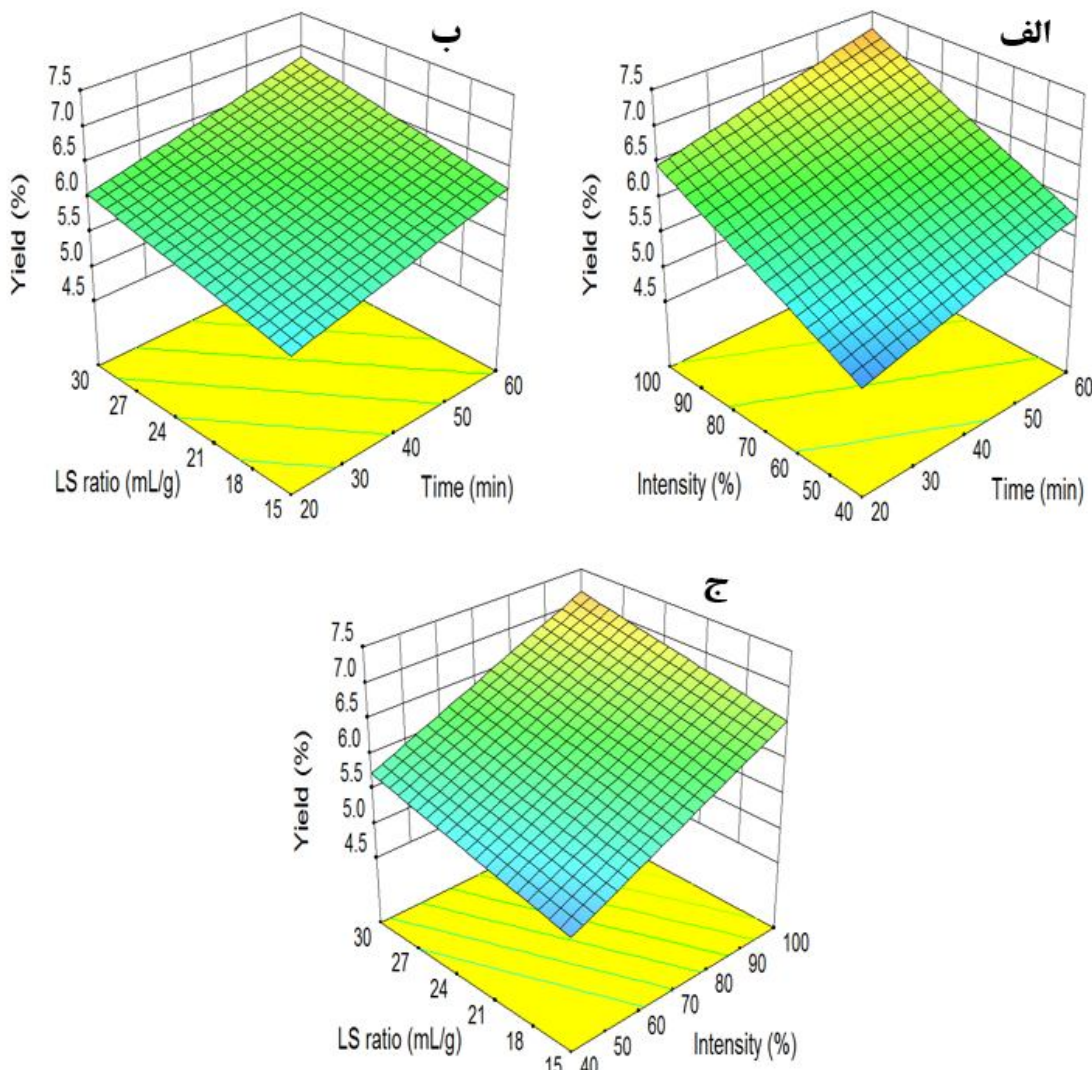
تاثیر شرایط استخراج بر روی راندمان پکتین

بهترین روش برای به تصویر کشیدن اثرات متغیرهای مستقل بر روی یک پاسخ، ترسیم نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی مدل است. هدف اصلی از نمودار سطح پاسخی هرچه موثرتر مقادیر بهینه متغیرهای مستقل آزمایشی است به‌نحوی که مقدار پاسخ مورد نظر بیشترین شود. با تجزیه و تحلیل این نمودارها می‌توان بهترین محدوده را برای پاسخ برآورد کرد (Li et al., 2012). در این پژوهش به‌منظور درک بهتر و مطالعه اثرات جداگانه و متقابل متغیرهای مستقل نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی با ثابت نگه داشتن مقدار یک فاکتور در سطح مرکزی آن و تغییر دادن دو فاکتور دیگر در محدوده آزمایشی آنها، رسم شدند. شکل 2 نمودارهای سطح پاسخ سه‌بعدی مربوط به اثرات شرایط استخراج بر روی راندمان پکتین را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، هنگامی که زمان استخراج، شدت صوت و نسبت حلال به نمونه به‌ترتیب در محدوده 60-20 دقیقه، 100-40%، و 1:30-1:15 میلی‌لیتر بر گرم افزایش داده شد، راندمان پکتین استخراج شده نیز به‌صورت خطی افزایش پیدا کرد. در این پژوهش راندمان پکتین استخراج شده از تفاله شاه‌توت تحت شرایط مختلف از 4/73 تا 7/68% (بر اساس وزن خشک تفاله) تغییر پیدا کرد (جدول 2). اخیراً Chen و همکاران (2015) محدوده راندمان پلی‌ساکاریدهای خام استخراج شده به کمک اولتراسوند از پودر میوه شاه‌توت و رسوب داده شده توسط اتانول را بین 1/77 تا 3/07% گزارش کردند که از مقادیر بدست آمده در این پژوهش کمتر است. احتمالاً دلیل این مسئله استفاده آنها از آب خنثی (اسیدی نشده) به‌عنوان حلال استخراج‌کننده (برخلاف محلول اسیدی با pH=2 در این پژوهش) بوده باشد. افزایش راندمان پکتین با افزایش زمان استخراج را می‌توان این‌طور تفسیر کرد که تورم و آبدار شدن ماده گیاهی می‌تواند در اثر کایتاسیون ناشی از امواج فراصوت تسریع شود (Wang et al., 2012). متلاشی شدن نامتقارن حباب‌های خیلی ریز در نزدیکی سطوح ماده گیاهی ایجاد میکروجهت‌هایی از حلال می‌کند که می‌تواند باعث شکستن دیواره سلولی و نفوذ بیشتر حلال به ماتریکس گیاهی شود که به نوبه خود باعث شستشو و تراوش بیشتر پکتین از ماده گیاهی به خارج (حلال احاطه‌کننده) شده و در نتیجه راندمان پکتین افزایش می‌یابد (Maran & Priya., 2014). مطابق شکل 2، راندمان پکتین استخراج شده از تفاله شاه‌توت شدیداً تحت تاثیر شدت صوت قرار گرفته است به‌نحوی که با افزایش

($p > 0/05$)

باقریان و همکاران (2011) و Minjares-Fuentes و همکاران (2014)، نیز در استخراج پکتین به کمک اولتراسوند از پوست گریب‌فروت و تفاله انگور، تاثیر غیرمعنی‌دار افزایش زمان سونیکاسیون را به ترتیب در محدوده 5-25 و 20-60 دقیقه بر روی DE پکتین مشاهده کردند.

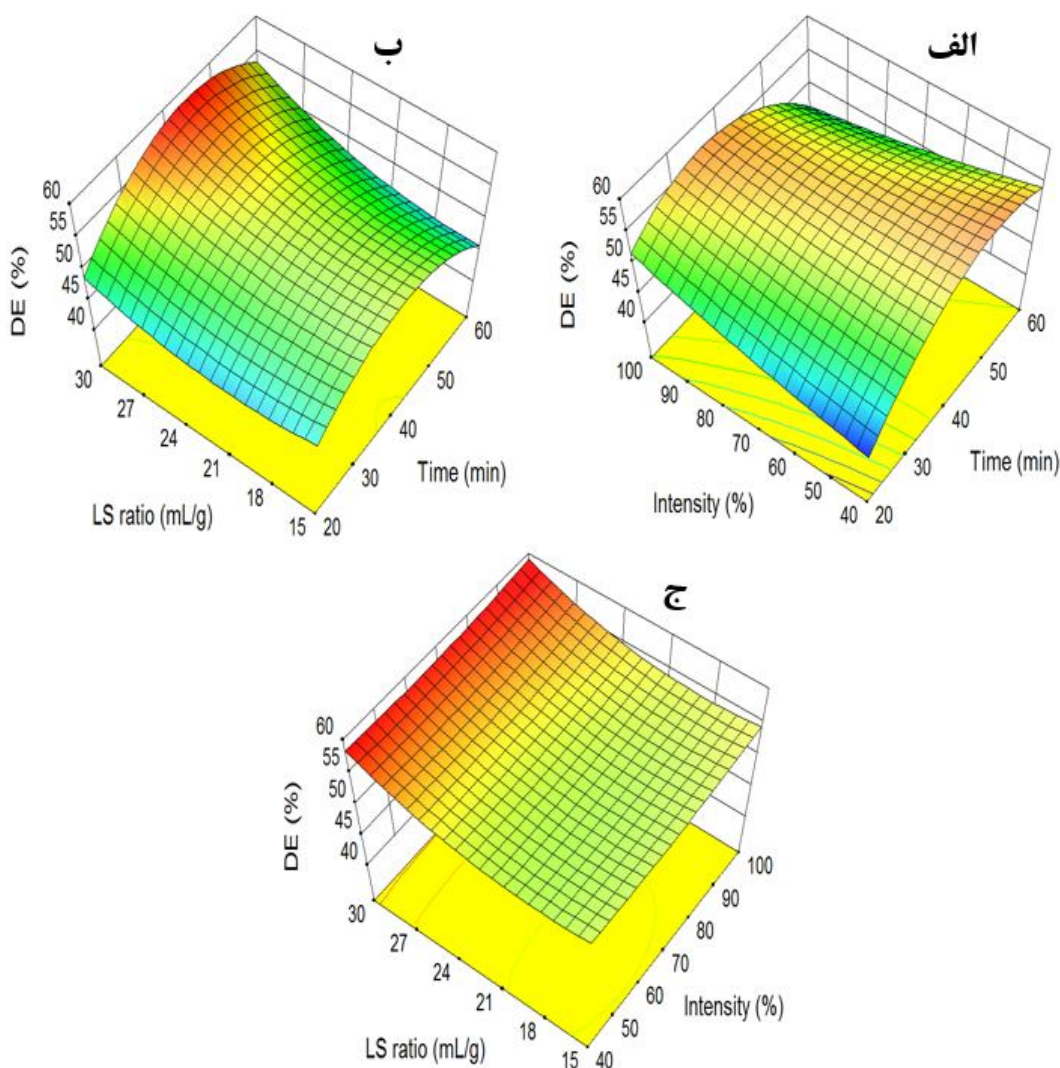
مشاهده می‌شود زمان استخراج به شکل یک منحنی درجه دوم بر روی DE پکتین اثر کرده است به گونه‌ای که افزایش زمان استخراج از 20 تا 40 دقیقه باعث افزایش DE و افزایش از 40 تا 60 دقیقه باعث کاهش DE گردیده است (شکل 3-الف). با افزایش شدت صوت نیز روند افزایشی در DE پکتین مشاهده می‌شود. هرچند که مطابق نتایج ANOVA (جدول 4)، اثرات اصلی (خطی) هیچ کدام از فاکتورهای نامبرده شده بر روی DE از نظر آماری معنی‌دار نیست



شکل 2- نمودارهای سطح پاسخ نشان دهنده اثرات شرایط استخراج به کمک اولتراسوند بر روی راندمان پکتین

استخراج شده با روش مرسوم و در شرایط زمان و درجه حرارت استخراج به ترتیب 1/5 ساعت و 95°C از پوست میوه کاکائو، غیرمعنی‌دار گزارش کرده بودند.

شکل 3-ب و 3-ج نشان می‌دهد که می‌توان پکتینی با DE نسبتاً بالا (~58%) در نسبت‌های بالای حلال به نمونه بدست آورد. با این وجود، Chan و Choo (2013) تاثیر افزایش نسبت حلال به نمونه از 1:10 تا 1:25 میلی‌لیتر بر گرم را بر روی DE پکتین



شکل 3- نمودارهای سطح پاسخ نشان‌دهنده اثرات شرایط استخراج به کمک اولتراسوند بر روی درجه استری شدن (DE) پکتین

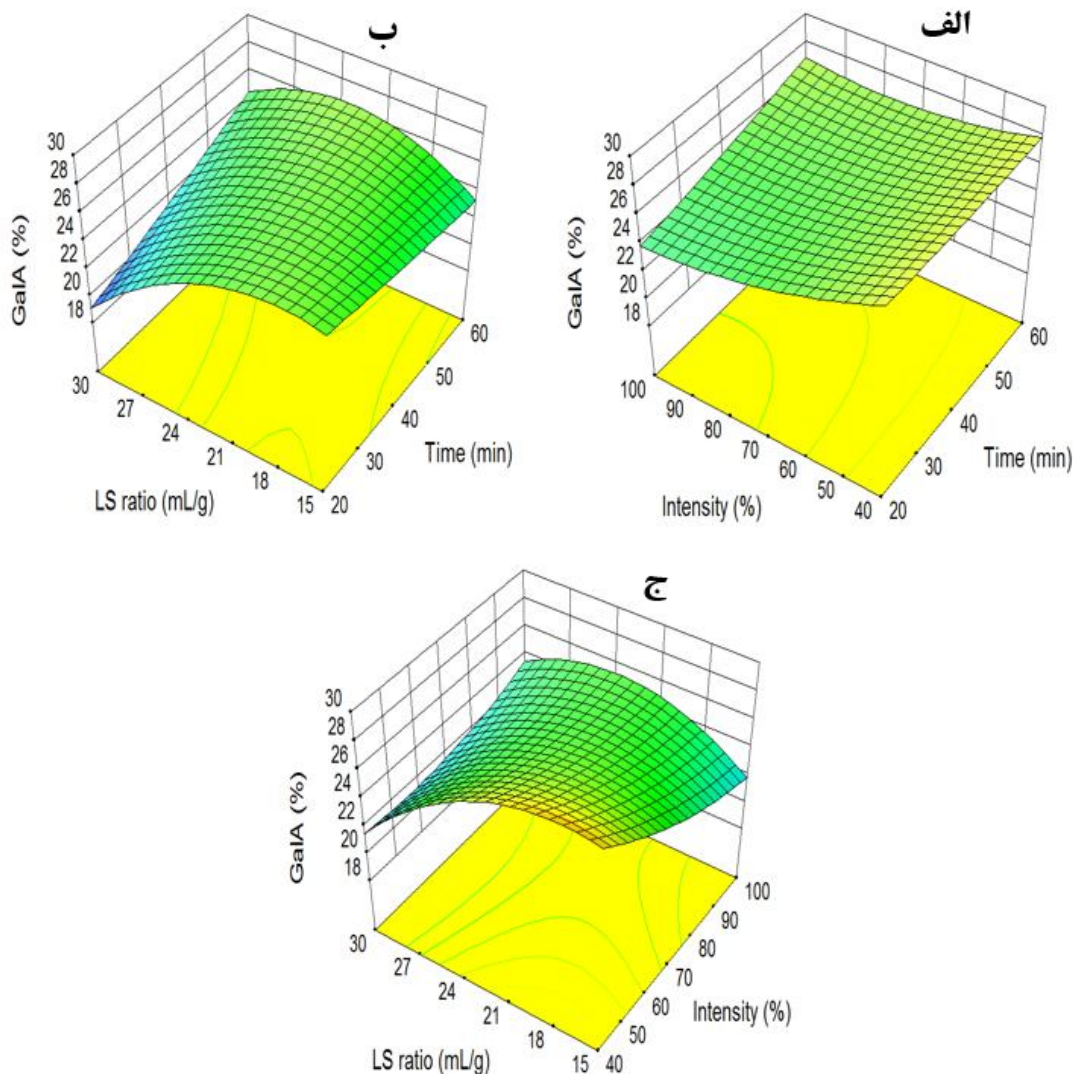
پکتین استخراج شده از انگور فرنگی سیاه (Hilz *et al.*, 2005)، پکتین استخراج شده از تفاله میوه‌های خانواده توت (انگور فرنگی قرمز و سیاه، تمشک و آق‌طی) (Cserjési *et al.*, 2011)، برای پلی‌ساکاریدهای خام استخراج شده به کمک اولتراسوند از پودر میوه شاه‌توت (Chen *et al.*, 2015). احتمالاً علت پایین بودن نسبی محتوای GalA، حضور مونوساکاریدهای دیگری (قندهای خنثی) مانند رامنوز، آرابینوز، گالاکتوز و ... باشد که مقادیر بالای این مونوساکاریدها برای پلی‌ساکارید استخراج شده از میوه شاه‌توت و توت سفید نشان داده شده است (Lee *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015). استخراج در مقیاس آزمایشگاهی عموماً

اثر شرایط استخراج بر روی محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین

محتوای گالاکتورونیک اسید (GalA) نشان‌دهنده خلوص پکتین استخراج شده است و مطابق سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (FAO) پکتین تجاری بایستی حاوی حداقل 65% GalA باشد (Maxwell *et al.*, 2012). در این پژوهش محتوای GalA پکتین بدست آمده از تفاله شاه‌توت تحت شرایط مختلف استخراج بین 18/70 تا 31/45% متغیر بود که نشان می‌دهد خلوص پکتین تا حدودی پایین است. طیف گسترده‌ای برای محتوای GalA پکتین میوه‌های خانواده توت گزارش شده است، برای مثال 20-50% برای

نشان داده است که با افزایش زمان استخراج، محتوای GalA پکتین نیز به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد (Liu *et al.*, 2007; Garna *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2012; Chan & Choo, 2013). این موضوع به جدا شدن ترکیبات غیرپکتینی از پکتین (Constenla & Lozano, 2003) و نیز به افزایش هیدرولیز زنجیره‌های جانبی حاوی قندهای خنثی که جزئی از ساختار خود پکتین است (Chan & Choo, 2013)، نسبت داده شده است.

ملایم‌تر از هیدرولیز با اسید داغ در روش استخراج صنعتی است، از اینرو ساختار دست‌نخورده پکتین به همراه قندهای خنثی و نیز دیگر ترکیبات غیرپکتینی می‌تواند حفظ شود (Lin *et al.*, 2016). شکل 4 تاثیر شرایط استخراج به کمک اولتراسوند را بر روی محتوای GalA پکتین نشان می‌دهد. افزایش زمان استخراج منجر به افزایش محتوای GalA پکتین شد، هرچند که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. مطالعات قبلی در استخراج پکتین با روش مرسوم



شکل 4- نمودارهای سطح نشان دهنده اثرات شرایط استخراج به کمک اولتراسوند بر روی محتوای گالاکتورونیک اسید (GalA) پکتین

ضرایب رگرسیونی معادله مدل (معادله 6) نشان داد که با افزایش شدت صوت محتوای GalA پکتین در مجموع به صورت خطی کاهش و با افزایش نسبت حلال به نمونه نیز به صورت خطی افزایش

اثر متقابل بین نسبت حلال به نمونه با هریک از فاکتورهای زمان استخراج و شدت صوت بر روی محتوای GalA را می‌توان به ترتیب در شکل 4-ب و 4-ج مشاهده کرد. نتایج ANOVA (جدول 4) و

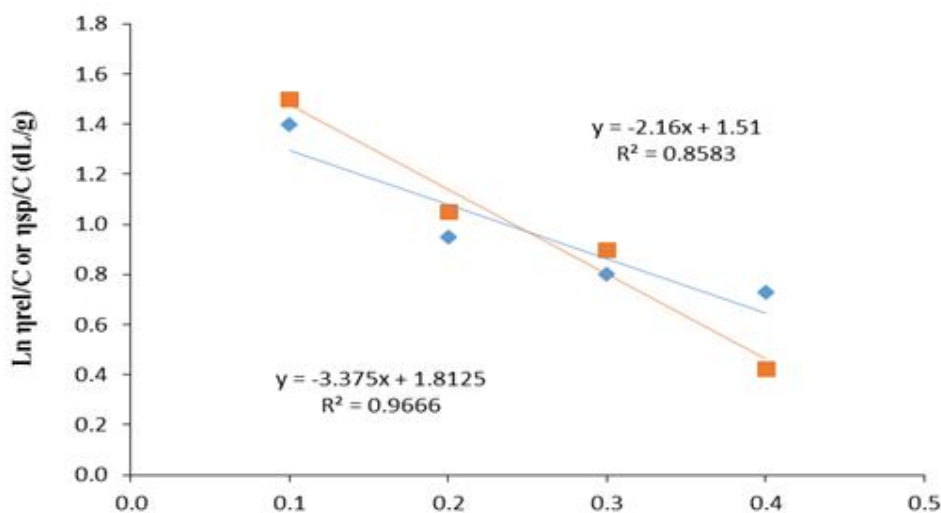
پیدا کرد ($p < 0/05$).

ویسکوزیته ذاتی ($[\eta]$) و وزن مولکولی متوسط (M_v)

شکل 5 نمودارهای هاگینز و کرامر را برای تعیین ویسکوزیته ذاتی پکتین نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود معادله کرامر برازش بهتری را نسبت به داده‌های آزمایشگاهی نشان داده است ($R^2 = 0/96$). میانگین عرض از مبدا دو نمودار به‌عنوان ویسکوزیته ذاتی پکتین در نظر گرفته شد که برابر بود با 1/66 دسی‌لیتر بر گرم. با جایگزین کردن این مقدار در معادله Mark-Houwink-Sakurada، مقدار وزن مولکولی متوسط پکتین 50/03 kDa بدست آمد که در محدوده وزن مولکولی متوسط گزارش شده برای پکتین‌های تجاری (50-150 kDa) قرار می‌گیرد (Nussinovitch, 2005). با این وجود، این مقدار وزن مولکولی متوسط از مقادیر گزارش شده برای پکتین استخراج شده به کمک اولتراسوند در شرایط مشابه از پوست گریپ فروت (109/54 kDa، 56/4-84/4 kDa) و نیز از پالپ چغندر قند (89/4 kDa) کمتر است (Bagherian *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). وزن مولکولی پکتین بسته به ماده اولیه و روش استخراج آن ممکن است بسیار متغیر باشد (Barrett *et al.*, 2004).

نقطه بهینه استخراج

شرایط بهینه استخراج برای دستیابی به حداکثر راندمان، حداکثر DE و حداکثر محتوای GalA در استخراج پکتین به کمک اولتراسوند از تفاله شاه‌توت با استفاده از تابع مطلوبیت روش بهینه‌سازی عددی تعیین شد. تکنیک بهینه‌سازی عددی نقطه‌ای را معین می‌کند که در آن نقطه مقدار عددی تابع مطلوبیت ماکسیمم شود (Prakash *et al.*, 2013). برای این منظور متغیرهای مستقل مورد بررسی در محدوده آزمایش در نظر گرفته شدند. زمان استخراج 51 دقیقه، شدت صوت 100% و نسبت حلال به نمونه 30 میلی‌لیتر بر گرم به‌عنوان شرایط بهینه استخراج پکتین از تفاله شاه‌توت انتخاب شد. تحت شرایط بهینه، مقادیر راندمان، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین به ترتیب 7/39%، 56/11%، و 25/46% با مطلوبیت 74/4% پیش‌بینی شد که با توجه به آزمایشات تاییدی انجام شده در دو تکرار تفاوت معنی‌داری بین مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر بدست آمده مشاهده نشد.



شکل 5- نمودارهای هاگینز و کرامر برای پکتین استخراج شده از تفاله شاه‌توت

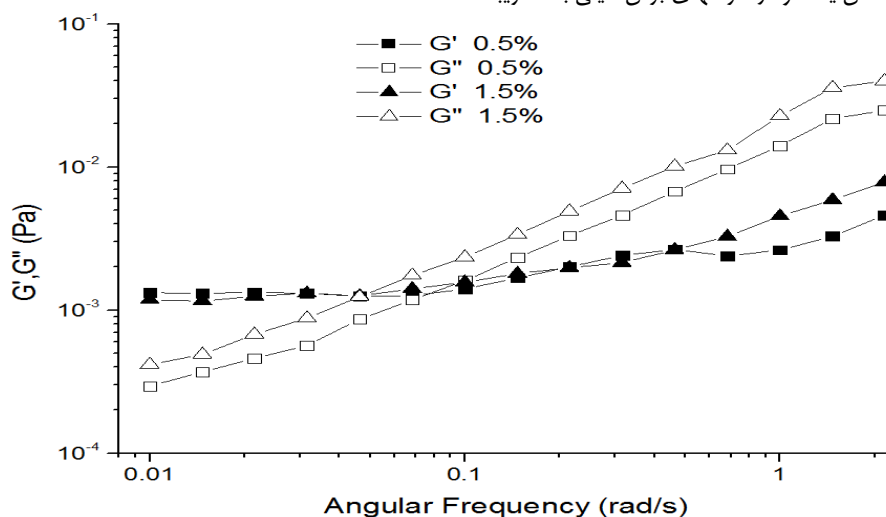
همانطور که ملاحظه می‌شود دیسپرسیون پکتین تفاله شاه‌توت در هر دو غلظت آزمایش شده رفتار یک ماده ویسکوالاستیک را از خود نشان داده است و بین مدول‌های G' و G'' در محدوده فرکانس‌های کم (تقریباً 0/05-0/07 رادیان بر ثانیه) تقاطع رخ داده است. فرکانس تقاطع مدول‌های G' و G'' شاخص خوبی برای رفتار ویسکوالاستیک یک ماده است (Iagher *et al.*, 2002) و شروع رفتار الاستیک یا نزدیک شدن حال ژل را نشان می‌دهد (Norziah *et al.*, 2001).

خواص رئولوژیک

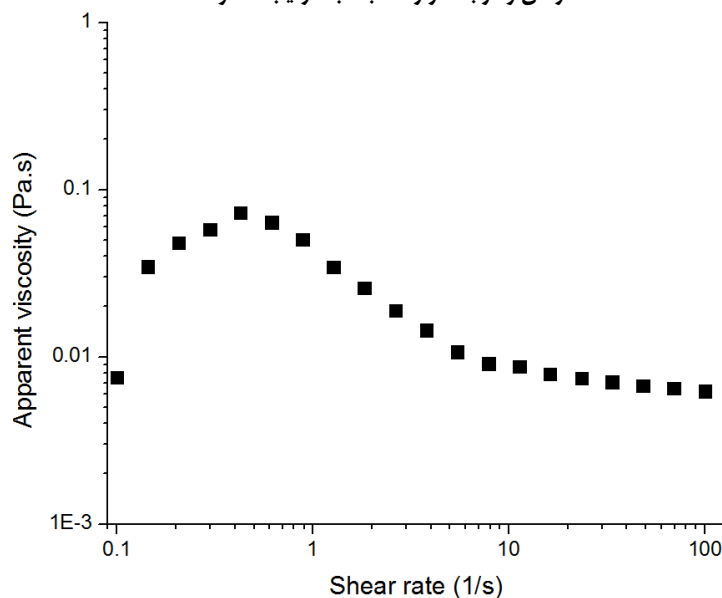
آزمون روبش فرکانس در محدوده 0/01-100 رادیان بر ثانیه (داده‌های مربوط به فرکانس‌های بالاتر از 2 رادیان بر ثانیه نشان داده نشده است) بر روی نمونه‌ای از پکتین استخراج شده از تفاله شاه‌توت در غلظت‌های 0/5 و 1/5% و در کرنش و درجه حرارت ثابت به ترتیب 1% و 25°C انجام شد. شکل 6 تغییرات مدول‌های الاستیک (G') و ویسکوز (G'') را به‌صورت تابعی از فرکانس نشان می‌دهد.

ثابت باقیمانده است. این روند نشان‌دهنده رفتار غیرنیوتنی از نوع رقیق‌شوندگی با برش در سرعت‌های برش کم (تقریباً کمتر از 10) و رفتار نیوتنی در سرعت‌های برش بالا (تقریباً بین 10 تا 100) می‌باشد. رفتار رقیق‌شوندگی با برش برای پکتین‌های استخراج شده از دیگر مواد گیاهی از جمله پالپ توت‌سیاه، پوست غلاف کاکائو و سیب نیز گزارش شده است (Hwang & Kokini, 1992; Min *et al.*, 2011; Vriesmann *et al.*, 2012; Haminiuk *et al.*, 2008).

هرچه فرکانس تقاطع پایین‌تر باشد سهم ویژگی الاستیک یک ماده نسبت به ویژگی ویسکوز آن بیشتر می‌شود (Iagher *et al.*, 2002). شکل 7 منحنی ویسکوزیته ظاهری بر حسب سرعت برش را برای دیسپرسیون پکتین در غلظت 1/5% وزنی / حجمی نشان می‌دهد. اگر قسمت اولیه افزایش کاذب در ویسکوزیته را که ناشی از خطای اندازه‌گیری دستگاه است در نظر نگیریم، مقدار عددی ویسکوزیته ظاهری محلول پکتین با افزایش سرعت برش در محدوده 0/5-100 بر ثانیه با شیب تند کاهش یافته و در سرعت‌های برش خیلی بالا تقریباً



شکل 6- تغییرات مدول‌های G' و G'' با فرکانس زاویه‌ای برای نمونه پکتین استخراج شده از تفاله شاه‌توت در غلظت 0/5 و 1/5 درصد و در کرنش و درجه حرارت ثابت به ترتیب 1% و 25°C



شکل 7- منحنی ویسکوزیته محلول پکتین استخراج شده از تفاله شاه‌توت در غلظت 1/5 درصد وزنی / حجمی و دمای 25 °C

افزایش هر سه پارامتر به صورت خطی افزایش پیدا کرد که سهم شدت صوت در استخراج پکتین به مراتب بیشتر از دو پارامتر دیگر بود. پکتین استخراج شده از تفاله شاه توت دارای درجه استری شدن کم تا متوسط و خلوص نسبتاً پایین در شرایط آزمایشی بود که با وجود این در آزمایشات رئولوژیک نشان داد که دارای خواص ویسکوالاستیک و قدرت تشکیل ژل در غلظت‌های کم است.

نتیجه‌گیری

استخراج به کمک اولتراسوند (UAE) به‌عنوان یک جایگزین بالقوه روش مرسوم استخراج، برای جداسازی پکتین از تفاله شاه توت در این پژوهش به کار گرفته شد و شرایط استخراج با استفاده از یک طرح مرکب مرکزی با 3 فاکتور در 3 سطح بهینه‌سازی شد. نتایج نشان داد که زمان استخراج، شدت صوت و نسبت نمونه به حلال هر سه شدیداً بر روی راندمان استخراج پکتین اثرگذار هستند و راندمان با

منابع

- Anger H, Berth G (1986) Gel permeation chromatography and the Mark-Houwink relation for pectins with different degrees of esterification. *Carbohydrate polymers* 6(3): 193-202.
- Bochek, A.M., Zabivalova, N.M., & Petropavlovskii, 2001, Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 74(5), 796-799.
- Belafi-Bako, K., Cserjesi, P., Beszedes, S., Csanadi, Z., Hodur, C., 2012, Berry pectins: microwave-assisted extraction and rheological properties, *Food Bioprocess Technology*, 5, 1100-1105.
- Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A., & Mohtashami, M., 2011, Comparisons between conventional, microwave and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50, 1237-1243.
- Barrett, D.M., Somogyi, L., & Ramaswamy, H., 2004, Processing fruits: science and technology, second edition, CRC press, chapter 6, p. 114.
- Cserjési, P., Bélafi-Bakó, K., Csanádi, Z., Beszédes, S., Hodúr, C., 2011, Simultaneous recovery of pectin and colorants from solid agro-wastes formed in processing of colorful berries. *Prog. Agri. Eng. Sci.* 7, 65-80.
- Chan, C-Y., Choo, W-S., 2013, Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chemistry*, 141, 3752-3758.
- Ganesh Moorthy, I., Prakash Maran, J., Muneeswari Surya, S., Naganyashree, S., Shivamathi, C.S., 2014, Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, Article in press.
- Hilz, H., Bakx, E., Schols, H., & Voragen, A., 2005, Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers*, 59, 477-488.
- Hojjatpanah, G., Fazaeli, M., and Emam-Djomeh, Z., 2011, Effects of heating method and conditions on the quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 956-962.
- Haminiuk, C.W.I., Sierakowski, M-R., Izidoro, D., Maciel, G.M., Scheer, A.P., & Masson, M.L., 2008, Effect of heat treatment on pectic fractions and apparent viscosity of whole blackberry (*Rubus* spp.) pulp. *International Journal of Food Engineering*, 4(4), Article 13.
- Iagher, F., Reicher, F., & Ganter, J.L.M.S., 2002, Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 9-17.
- Ibarz, A., Pagan, A., Tribaldo, F., Pagan, J., 2006, Improvement in the measurement of spectrophotometric data in the m-hydroxydiphenyl pectin determination methods, *Journal of Food Control*, 17, 890-893.
- Imran, M., Khan, H., Shah, M., Khan, R., and Khan, F., 2010., Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 11(12)- 973-980.
- Koubala, B. B., Kansci, G., Mbome, L. I., Crépeau, M.-J., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C., 2008, Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. *Food Hydrocolloids*, 22, 1345-1351.
- Koocheki, A., Taherian, A.R., Razavi, S.M.A., Bostan, A., 2009, Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *Food Hydrocolloids*, 23, 2369-2379.
- Landbo, A. K., & Meyer, A. S., 2001, Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3169-3177.
- Liu, Z.D., Wei, G.H., Guo, Y.C., Kennedy, J.F., 2006, Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydrate Polymers*, 64 (4), 548-552.
- Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y., and Yao, J., 2010, Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresource Technology*, 101, 3268-3273.

- Lee, J.S. et al. (2013), Purification, characterization and immunomodulating activity of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit Oddi (*Morus alba* L.), *International Immunopharmacology*, 17, 858–866
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M.C., Meza-Velazquez, J.A., Simal, S., Rosello, C., 2014, Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach, *Carbohydrate Polymers*, 106, 179–189.
- Nussinovitch, A., 1997, Hydrocolloid applications: gum technology in the food and other industries, first edition, Springer-Science+Business Media, B.V., chapter 4, p. 93
- Norziah, M., Kong, S.S., Abd Karim, A., & Seow, C.C., 2001, Pectin–sucrose–Ca²⁺ interactions: effects on rheological properties. *Food Hydrocolloids*. 15(4-6),491–498.
- Nwabueze, T.U., 2010, Review article: Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems, *International Journal of Food Science & Technology*, 45(9), 1768-1776.
- Panchev, I., Kirchev, N., Kratchanov, C., 1988, Improving pectin technology.: II. Extraction using ultrasonic treatment, *Journal of Food Science and Technology*, 23, 337–341.
- Panchev, I., Kirchev, N., Kratchanov, C., 1994, On the production of low esterified pectins by acid maceration of pectic raw materials with ultrasound treatment. *Journal of Food Hydrocolloids*, 8, 9-17.
- Pérez-Gregorio, M.R., Regueiro, J., Alonso-González, E., Pastrana-Castro, L.M., Simal-Gándara, J., 2011, Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1793-1801.
- Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandhama, K., & Sridhar, R., 2013, Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97, 703-709.
- Prakash Marana, J., & Priya, B., 2014, Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, Article in press.
- Rosenbohm, C., Lundt, I., Christensen, T. M. I. E., & Young, N. W. G., 2003, Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by 1H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. *Carbohydrate Research*, 338, 637e649.
- Shaha, R.K., Yoga Nayagi A.P. Punichelvana, and Asrul Afandi, 2013, Optimized extraction condition and characterization of pectin from kaffir lime (*Citrus hystrix*), *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*, 1(2), 1-11.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A.K., 1997, Chemistry and uses of pectin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 47–73.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T.J., 2001, Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 137–142.
- Willats, W.G.T., Knox, J.P., & Mikkelsen, J.D., 2006, Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 97-104.
- Wu, H., Hulbert, G.J., Mount, J.R., 2001. Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yoghurt starter. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 211–218.
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D., 2014, Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel, *Journal of Food Engineering*, 126, 72–81.
- Yang, B., Liu, X., Gao, Y., 2009, Extraction optimization of bioactive compounds crocin, geniposide and total phenolic compounds from Gardenia Gardenia jasminoides Ellis fruits with response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 610–615.
- Ying, Z., Han, X., Li, J., 2011, Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 127, 1273–1279.

Optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from black mulberry (*Morus nigra.L*) pomace

V. Mosayebi¹, F. Tabatabaei Yazdi^{2*}, Z. Emam Djomeh³

Received: 2015.10.09

Accepted: 2016.02.13

Introduction: Pectin is a complex heteropolysaccharide presented naturally in the middle lamella and primary cell walls of plant tissues. Pectin is mostly composed of a linear backbone of α -(1, 4) linked D-galacturonic acid residues which are partially esterified with methyl alcohol or acetic acid at the carboxylic acid. Pectin is widely used as a gelling agent in food systems such as jams and jellies, fruit juices, confectionaries, bakery fillings and as a stabilizer in acidified milk drinks. Black mulberry (*Morus nigra.L*), originating from Iran, is a juicy fruit with dark red color and slightly acidic flavor. Black mulberry has gained an important position in fruit markets and food industry due to its distinctive flavor and phytonutrients in recent years. Black mulberries can be consumed as fresh or processed into several products such as juice, marmalades, liquors, natural dyes or even be used as frozen fruit in ice cream production. However, due to short harvesting season and susceptibility to spoilage, black mulberries are mostly processed into juice besides its fresh consumption. Press cake residue or pomace is the main by-product which is generated in large amounts from the commercial juice extraction processes from berry fruits which contain several bioactive compounds and valuable ingredients including antioxidants, phenolics, pigments, pectin and so on. These berry pomaces are considered suitable for pectin recovery although their pectin content is somewhat lower in comparison to rich known sources of pectin. Recently, ultrasound assisted extraction technique, as a novel method of extraction, has gained remarkable attention due to its some advantageous effects including shorter extraction time, reduced solvent and energy consumption and higher yield and better quality of extracted compounds as compared to conventional acid extraction method. Therefore, the present work was aimed to evaluate and optimize the ultrasound assisted extraction parameters (time of extraction, ultrasound power and liquid/solid ratio) to maximize the extraction yield, degree of esterification and galacturonic acid content of pectin from black mulberry pomace using three level three factor face centered central composite design.

Materials and methods: Fresh and fully ripe black mulberry fruits were purchased from a local fruit market in Karaj (Iran) and subsequently pressed to separate pomace from juice. The obtained pomace was then vacuum dried (until $7.8 \pm 1\%$ moisture content), ground to obtain a homogenous powder, sieved, filled into polyethylene containers, and stored at refrigerator. Pectin extraction from this powdered pomace was carried out using an ultrasonic bath at operating frequency of 35 kHz under different parameters including extraction time (20-60 min), ultrasonic intensity (40-100%) and liquid-solid ratio (15:1 to 30:1 mL/g). The initial pH value of the solution was adjusted to 2.0 by adding 1.0 N HCl solution. At the end of extraction, extracts were quickly cooled, centrifuged, filtered using Buchner funnel, concentrated by 5 fold, coagulated with 96% ethanol (ER=1.5) and left for 8 hours in room temperature. The precipitated pectin was separated by Buchner funnel, rinsed twice with 96% ethanol, dried under vacuum (45°C) and finally powdered. The degree of esterification of pectin was determined by titrimetric method according to Bocek et al. (2001). The galacturonic acid content was quantified by the colorimetric method with m-hydroxydiphenyl reagent using a spectrophotometer at 520 nm. The intrinsic viscosity $[\eta]$ of pectin was determined using a capillary tube viscometer and accordingly the viscosity average molecular weight $[M_v]$ was calculated from the Anger-Berth equation. Finally, the frequency sweep test was performed using a controlled stress rheometer to determine the values of storage modulus (G') and loss modulus (G''). The experimental design and statistical analysis were performed using response surface methodology (RSM).

1 and 2. MSc graduated and Professor, Food Science, Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Professor, Department of Food Science & Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

(*Corresponding Author Email: tabatabai@um.ac.ir)

Results and discussion: According to the obtained results, the extraction yield, degree of esterification and galacturonic acid content of pectin varied in the range of 4.73-7.68%, 42.42-58.33 and 18.70-31.45%, respectively. The extraction yield of pectin was linearly affected by the extraction conditions and its value significantly increased with increasing all the studied independent variables ($p < 0.0001$). The optimized conditions for highest predicted values of pectin yield (7.39%), degree of esterification (56.11%) and galacturonic acid content (25.46%) of pectin from black mulberry pomace were determined to be extraction time of 51.04 min, ultrasound intensity of 100% and liquid-solid ratio of 30:1 mL/g. The validation experiments were conducted and no significant difference was found between the observed values and the model predicted values. The rheological tests showed characteristic behaviors of shear thinning and viscoelastic for the extracted pectin sample. In addition, its intrinsic viscosity ($[\eta]$) and viscosity average molecular weight (M_v) were found to be 1.52 dL/g and 44.5 kDa, respectively.

Key words: Black Mulberry Pomace, Pectin, Yield, Galacturonic Acid Content, Optimization, Rheological Properties.