

ارزیابی متغیرهای استخراج بر خواص ژلی آگار جلبک پرورشی

Gracilariopsis persica با روش سطح پاسخ (RSM)

محمد رضا انتصاریان بیدگلی^۱، مسعود رضایی^{۱*}، علی معتمدزادگان^۲، عبدالرسول دریایی^۳

*_Rezai_ma@modares.ac.ir

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریائی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
 ۲- گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
 ۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۲

چکیده

در پژوهش حاضر با استفاده از روش سطح پاسخ^۱ (RSM) روند خواص ژلی ویسکوزیته و دمای هیستریزس ژل آگار از آگاروفیت پرورشی *Gracilariopsis persica* و بهینه‌سازی مدل آن مطالعه شد. بر اساس نتایج حاصل از تاثیر سه متغیر مستقل غلظت قلیا (۲-۸ W/V%)، دمای استخراج (۹۰-۱۲۰°C) و زمان استخراج (۲۴۰-۴۵ دقیقه) در پنج سطح بر ویسکوزیته و دمای هیستریزس، مشخص شد که دما و زمان استخراج از جمله پارامترهای معنادار فرآیند بر ویسکوزیته و دمای هیستریزس بودند ($p < 0/05$). مدل چند جمله‌ای و شرایط بهینه برای بیشترین مقدار ویسکوزیته و دمای هیستریزس، برای متغیرهای غلظت قلیا، دما و زمان استخراج به ترتیب مقادیر ۳/۲٪، ۱۱۰°C و ۲۰۰ دقیقه به دست آمد. مقدار پیشنهادی مدل برای ویسکوزیته و دمای هیستریزس ژل به ترتیب ۲۴/۷ cP و ۶۵°C به دست آمد که در تطابق با داده‌های پیشنهادی مدل، رضایت بخش بودند ($p > 0/05$).

لغات کلیدی: آگار، ویسکوزیته، دمای هیستریزس، روش RSM، *Gracilariopsis persica*

*نویسنده مسئول

^۱ Response Surface Methodology

مقدمه

آگار پلی ساکارید ژله‌ای است که در آب و یا محلول قلیا از دیواره سلولی برخی جلبک‌های قرمز به دست می‌آید. این فیکوکلوئید که در آب سرد نامحلول و در آب جوش محلول است به دلیل اختلاف موجود بین دمای ژله‌ای و دمای ذوب آن، که اصطلاحاً دمای هیستریزیس گفته می‌شود، کاربردهای بسیار زیادی در صنایع مختلف از جمله صنعت غذا (۸۰٪) و بیوتکنولوژی (۲۰٪) پیدا کرده است (Kumar & Fotedar, 2009). این گروه از هیدروکلوئیدها قادرند محلول‌هایی با ویسکوزیته بالا در غلظت‌های پایین تولید کنند که این امر بر کاربری آن‌ها افزوده است (Foegeding, 2007). در واقع از آگار به منظور تغلیظ نمودن، تثبیت کردن، افزایش ویسکوزیته، بهبود قابلیت برش در فرآورده‌های کنسروی (گوشتی و ماهی) و همچنین به عنوان کلوئیدی محافظ در فرآورده‌های گوشتی (به ویژه ماهی) استفاده می‌کنند (Armisen, 1995; Venugopal, 2009).

کاربردهای آگار اساساً مبنی بر خواص ژلی چون استحکام ژل، هیستریزیس بالا و برگشت‌پذیری کامل ژل می‌باشد که خواص منحصر به فردی از طریق ساختار ژله‌ای خاص ایجاد می‌کند. بنابراین ویسکوزیته، دمای تشکیل ژل، نقطه ذوب و همچنین دمای هیستریزیس، جز خواص ژلی مهم و پارامترهای موثر در کیفیت آگار محسوب می‌شوند (Pereira-Pacheco et al., 2007). آگاروفیت‌های مختلفی برای استخراج آگار وجود دارد، اما پژوهش‌ها نشان می‌دهد جلبک‌های گراسیلاریا از جمله گونه‌های مهم در این صنعت در سراسر جهان می‌باشند که بر اساس مطالعات استفاده از این آگاروفیت به عنوان ماده خام آگار از ۶۳٪ در سال ۱۹۹۹ به ۸۰٪ در سال ۲۰۰۹ رسیده است (Vergara-Rodarte et al.; Bixler & Porse, 2011). که در این میان گزارش‌های مختلفی نیز از تاثیر متغیرهای مختلف بر استخراج آگار و بررسی خواص ژلی آن گزارش شده است (Arvizu-Higuera et al., 2007; 2008). بنابراین استنباط می‌شود متغیرهای مختلفی در پروسه استخراج بر کیفیت آگار استحصالی موثر می‌باشد، لذا بهینه‌سازی آن‌ها برای رسیدن به مطلوب‌ترین نتیجه، از اهمیت بسیار

بالایی برخوردار است (Soriano & Bourret, 2003). (Marinho RSM) که در این میان رویه سطح پاسخ (RSM) یکی از روش‌های متداول برای امر بهینه‌سازی است. با وجود مطالعات محققان در این زمینه، تاکنون گزارشی در این مورد از آگاروفیت *Gp. persica* منتشر نشده است. ضمن این که، آگاروفیت مذکور حاوی مزایایی چون بومی بودن می‌باشد. بدیهی است با توجه به وجود این منبع پرورشی در کشور و پتانسیل تولید فیکوکلوئید آگار، در این مطالعه از جلبک پرورشی *Gp. persica* استفاده گردید. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی متغیرهای استخراج (غلظت قلیا، دمای استخراج و زمان استخراج) بر خواص ژلی ویسکوزیته و دمای هیستریزیس ژل آگار استحصالی از آگاروفیت *Gp. persica* با به کارگیری روش سطح پاسخ (روش RSM) می‌باشد، چرا که روشی مناسب برای دستیابی به شرایط بهینه فرآورده‌های با کیفیت همراه با کاهش هزینه‌ها و افزایش دقت می‌باشد.

مواد و روش‌ها**تهیه آگاروفیت *Gp. persica* و آماده‌سازی نمونه**

جلبک‌های پرورشی *Gp. persica* از سایت‌های پرورشی واقع در مرکز تکثیر و پرورش توسعه آبزیان بندر کلاهی واقع در استان هرمزگان با حمایت سازمان شیلات مهیا گردیدند. به منظور حذف ناخالصی با آب شست و شو داده شدند، سپس به منظور جلوگیری از هیدرولیز آنزیمی و رشد میکروارگانیسم‌ها در فرمالین ۱۰ درصد غوطه‌ور گردیدند. پس از عملیات شست و شوی مجدد، نمونه‌ها برای مدت زمان ۸ ساعت در آون 60°C قرار گرفتند. در پایان نمونه‌ها را پودر نموده (اندازه سایز ۳۰۰-۲۵۰ میکرومتر) و به منظور جلوگیری از در معرض قرار گرفتن رطوبت محیط، در کیسه‌های پلی‌اتیلن زیپ‌دار بسته‌بندی و در دمای 4°C نگهداری شدند (Freil-Pelegrin & Pereira-Pacheco et al., 2007; Murano, 2005).

پروسه استخراج آگار

استخراج فیکوکلوئید آگار با اندکی تغییر در پارامترهای پیش‌فرآوری و استخراج به روش (Freil-Pelegrin &

تعیین دمای هیستریزس ژل

دمای هیستریزس بر اساس اختلاف موجود بین دمای تشکیل ژل آگار و نقطه ذوب آن محاسبه می‌گردد، لذا برای تعیین این پارامترها از روش - & Pelegrín (Freile Robledo, 1997b) با اندکی اصلاح پیروی شد. در ابتدا محلول (w/v) ۱/۵٪ آگار در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر داغ تهیه شد. سپس فوراً به لوله‌های آزمایش درب‌دار (ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر و قطر ۱۵ میلی‌متر) انتقال داده شدند. ضمناً یک ترموکوپل متصل به دیتا لاگری نیز درون لوله تعبیه گردید. گوی پلاستیکی (وزن ۶ میلی‌گرم، قطر ۱۰ میلی‌متر) درون لوله رها شد. لوله حاوی ژل به صورت افقی و عمودی درون حمام آبی با دمای ۲۵ °C در حرکت بود که لحظه توقف گوی توسط دیتا لاگر متصل به رایانه به عنوان دمای تشکیل ژل ثبت می‌شد.

سپس برای تعیین نقطه ذوب نیز، محلول آگار (w/v) ۱/۵٪ در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و در لوله‌های آزمایش (ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۱۵ میلی‌متر) جاری شد. پس از رسیدگی ژل به مدت ۱۲ ساعت در دمای محیط (۱±۲۵ °C)، یک گوی (وزن ۲۰ میلی‌گرم، قطر ۷ میلی‌متر) بر روی سطح ژل قرار داده و لوله‌های حاوی ژل نیز به حمام روغن انتقال داده شدند. همزمان با افزایش دمای حمام بن ماری از ۵۰ °C تا ۱۲۰ °C با کمک یک ترمومتر دیجیتالی دقیق، در دمایی که این گوی به کف لوله آزمایش سقوط کرد به عنوان نقطه ذوب گزارش گردید.

(Murano, 2005) صورت پذیرفت. برای هر تیمار از ۱۰ گرم پودر جلبکی استفاده شد. به منظور هیدرولیز گروه‌های سولفات و استخراج بهتر پلی‌ساکارید از دیواره سلولی جلبک، فرآیند پیش‌فرآوری قلیایی به مدت ۱۲ ساعت در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول NaOH در پنج نقطه از غلظت‌های سدیم هیدروکسید (۲، ۳/۲، ۵، ۶/۸ و ۸ درصد حجمی/جرمی) در دمای محیط انجام گرفت و سپس در حمام آب ۹۰ °C برای مدت زمان ۳ ساعت حرارت داده شد. پس از شست و شوی نهایی، عملیات استخراج آگار از جلبک‌های پیش تیمار یافته، در ۳۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۲ در محدوده‌های دمایی (۹۰، ۹۶، ۱۱۴، ۱۰۵ و ۱۲۰) و زمانی (۴۵، ۸۵، ۱۴۲، ۲۰۰ و ۲۴۰ دقیقه) در حمام روغن صورت پذیرفت. پس از تخلیص در مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۸ °C- منجمد گردید. پس از دی‌فراست در دمای محیط، ناخالصی‌های محلول تخلیه شدند. سپس با دستگاه آون در دمای ۶۰ °C برای مدت زمان ۲۴ ساعت خشک گردیدند. به منظور مقایسه با نمونه‌های تیمار یافته، استخراج آگار بومی به روش سنتی (بدون پیش‌فرآوری) نیز صورت گرفت، که جلبک‌ها (۱۰ گرم) برای ۱۲ ساعت در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای محیط آگیری شدند. سپس استخراج برای ۹۰ دقیقه در دمای ۹۰ °C در ۳۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۲ در حمام آبی صورت گرفت.

اندازه‌گیری ویسکوزیته

ویسکوزیته آگار با استفاده از دستگاه ویسکومتر بروکفیلد با اندکی تغییر از روش (Prasad et al., 2007) سنجش شد. برای این منظور محلول ۱/۵٪ آگار تهیه و میزان ویسکوزیته آن بر حسب واحد سانتی‌پواز^۲ با اسپیندل^۳ (S31) ویسکومتر، با میزان ۱۰۰ دور در دقیقه^۴ در دمای ۸۰ °C تعیین شد.

^۲ cP
^۳ Spindle
^۴ RPM

جدول ۱: محدوده و سطوح آزمایشی متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی ($\alpha = \pm 1/682$)

آزمایشات					محدوده	علامت	متغیرهای مستقل
$+\alpha$	+1	0	-1	$-\alpha$			
8	6/8	5	3/2	2	2-8	x_1	غلظت قلیا (درصد)
120	114	105	96	90	90-120	x_2	دما (سانتیگراد)
240	200	142	85	45	45-240	x_3	زمان (دقیقه)

جدول ۲: کد گذاری متغیرهای مستقل و مقادیر واقعی و پیش بینی مدل ویسکوزیته و دمای هیستریزس

دمای هیستریزس (سانتیگراد)		ویسکوزیته (سانتی پوآز)		کد متغیرهای مستقل			
Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	x_3	x_2	x_1	
60/83	61/3	23/43	24/8	0	0	0	1
60/83	60/2	23/43	26/6	0	0	0	2
60/83	59/55	23/43	20/2	0	0	0	3
60/83	62/8	23/43	25/1	0	0	0	4
60/83	63/7	23/43	22/6	0	0	0	5
60/83	58/2	23/43	21/3	0	0	0	6
61/12	60/2	9/6	9/6	-1	-1	-1	7
56/23	55/9	16/82	16	-1	-1	1	8
59/34	59/9	11/95	11/1	-1	1	-1	9
62/35	62/4	19/17	18/8	-1	1	1	10
66/41	66/3	15/71	17/2	1	-1	-1	11
61/53	62/2	11/23	11/2	1	-1	1	12
64/63	64/6	23/26	23/2	1	1	-1	13
67/65	69/5	18/78	19/9	1	1	1	14
61/62	61/8	19/88	19/6	0	0	-1/682	15
60/05	58/6	22/18	22/3	0	0	1/682	16
58/08	58/7	7/42	7/1	0	-1/682	0	17
61/73	60/5	15/75	15/9	0	1/682	0	18
61/76	62/35	13/73	15	-1/682	0	0	19
70/66	69/45	18/54	17/1	1/682	0	0	20

x_1 : غلظت قلیا (درصد)، x_2 : دمای استخراج (سانتیگراد)، x_3 : زمان استخراج (دقیقه)

Y_1 : مقدار واقعی، Y_2 : پیش بینی مدل

تجزیه تحلیل آماری و بهینه سازی

روش سطح پاسخ شامل تکنیک‌های ریاضی و آماری می‌باشد که در پیشرفت رابطه تابعی مناسب بین پاسخ و پارامترهای فرآیند استفاده می‌شود. بنابراین این روش برای توسعه، بهبود و بهینه‌سازی پروسه عملی و مفید می‌باشد (Myers & Montgomery, 2002; Mukhopadhyay & Khuri, 2010). در این پژوهش نیز جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل شامل غلظت قلیا

(x_1)، دمای استخراج (x_2) و زمان استخراج (x_3) بر میزان هیستریزس آگار استحصالی از روش سطح پاسخ تحت طرح مرکب مرکزی⁵ (CCRD) استفاده گردید. در این روش با انجام 6 تکرار در نقاط مرکزی به منظور تخمین خطای آزمایش، تکرار تمامی نقاط آزمایش ضروری نمی‌باشد. بنابراین مجموعاً 20 آزمایش برای 3

⁵ Central composite rotatable design

های x_1x_3 ، x_2^2 و x_3^2 از معناداری برخوردار بودند ($p < 0.05$).

برای دمای هیستریزیس نیز بر اساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس (جدول ۵) مقدار p -value و F -value به ترتیب کمتر از 0.0001 و $13/56$ برای مدل رگرسیون محاسبه گردید. برای عدم برآزش دمای هیستریزیس مقادیر p -value و F -value نیز به ترتیب 0.9219 و 0.33 به دست آمد.

از بین تمامی مولفه‌های ورودی برای دمای هیستریزیس (جدول ۶)، مولفه‌های خطی x_1 و x_2 معنادار بوده و از بین مولفه‌های همزمان و درجه دوم به ترتیب مولفه‌های x_1x_2 و x_3^2 از معناداری برخوردار بودند ($p < 0.05$). شایان ذکر است به جهت بهبود مدل، فقط برخی مولفه‌هایی که معنادار نبودند، از آنالیزهای بعدی حذف شدند و سایر مولفه‌ها جهت تعیین مدل مورد آنالیز قرار گرفتند.

ضریب تبیین R^2 برای ویسکوزیته و دمای هیستریزیس به ترتیب 0.9299 و 0.8622 به دست آمد. ضرایب تبیین تطابق یافته و پیش بینی شده نیز برای هر دو متغیر مذکور محاسبه شدند که در جدول ۵ آمده است. مقدار PRESS که معیاری از میزان تناسب یک مدل در هر یک از نقاط بوده به ترتیب برای ویسکوزیته و دمای هیستریزیس برابر با $93/21$ و $68/84$ محاسبه گردید. مقدار Adequate precision حاکی از دقت مناسب مدل بوده که برای ویسکوزیته $12/626$ و برای دمای هیستریزیس $15/470$ به دست آمد (جدول ۷).

به منظور فهم هر چه بیشتر عملکرد آزمایش‌ها و ارزیابی ویسکوزیته و دمای هیستریزیس ژل آگار، چهار گراف بسیار مفید در ذیل آمده است (شکل ۱). در واقع پس از دستیابی به مدل مورد نظر، مقادیر پیش‌بینی از محاسبه رابطه رگرسیون حاصل می‌گردد و مقادیر باقیمانده^۸ از اختلاف مقدار واقعی و مقدار پیش‌بینی شده حاصل می‌شود. شکل ۱-الف، مقدار مانده واقعی در برابر مقدار پیش‌بینی شده در مدل را نشان می‌دهد. در شکل ۱-ج، د می‌توان دریافت که هیچ Outlier وجود

متغیر در ۵ سطح طرح ریزی گردید که سطوح متغیرهای مستقل در جدول ۱ و تیمارهای آزمایش در جدول ۲ ذکر شده است.

برای طراحی آزمایش، آنالیز نتایج و بهینه سازی از نرم افزار دیزاین اکسپرت^۶ استفاده گردید. در این روش مدل سازی بین متغیر وابسته (Y) و متغیرهای مستقل (X) با معادله چند جمله ای ذیل بیان می‌گردد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Y نشان دهنده مقدار پاسخ پیش‌بینی شده (متغیرهای وابسته)، K نمایانگر تعداد متغیرها، x_i ، x_j ، ...، x_k متغیرهای مستقل، x_i^2 ، x_j^2 ، ...، x_k^2 اثرات مجذور متغیرها β_0 اثرات کنش متقابل بین متغیرها، β_{ij} (i = 1, 2, ..., k) اثرات خطی بین متغیرها، β_{ii} (i = 1, 2, ..., k) اثرات مجذور بین متغیرها، β_{ij} (i = 1, 2, ..., k; j = 1, 2, ..., k) اثرات متقابل بین متغیرها و ε خطای احتمالی است (Bezerra et al., 2008).

نتایج

مطابق با نتایج برآورد شده از آنالیز واریانس (جدول ۳) مقدار p -value و F -value برای ویسکوزیته آگار به ترتیب کمتر از 0.0001 و $18/25$ برای مدل رگرسیون به دست آمد. مقادیر p -value و F -value برای عدم برآزش^۷ دمای ویسکوزیته نیز به ترتیب 0.9420 و 0.24 برآورد شد.

فاکتورهای ممکن جهت حضور در فرآیند مدل‌سازی بر اساس p -value آن‌ها بررسی شد. نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴) نشان می‌دهد که برای ویسکوزیته از بین مولفه‌های خطی x_2 و x_3 معنادار بوده در صورتی که در بین مولفه‌های همزمان و درجه دوم به ترتیب فقط مولفه-

^۶ Design-Expert 7.01 (Stat-Ease, Inc, Minneapolis, MN, USA)
^۷ Lack of fit
^۸ Residuals

ندارد. در واقع Outlier مشاهده‌ای است که خیلی بزرگ‌تر یا کوچک‌تر از مقادیر مورد انتظار باشد و باقیمانده آن Dean & Voss,) بیشتر از حد مجاز (خط افقی) باشد (1999).

جدول ۳: نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس ویسکوزیته

منبع تغییرات	جمع مربعات	مربع میانگین	درجه آزادی	F-value	p-value
مدل رگرسیون	۵۲۱/۵۷	۶۵/۲۰	۸	۱۸/۲۵	> 0.0001
باقیمانده	۳۹/۲۹	۳/۵۷	۱۱		
عدم برازش	۸/۹۲	۱/۴۹	۶	۰/۲۴	۰/۹۴۲۰
خطای خالص	۳۰/۳۷	۶/۰۷	۵		
Corr total	۵۶۰/۸۶	-	۱۹		

جدول ۴: آنالیز آماری فاکتورهای دخیل در مدل ویسکوزیته

فاکتور	ضریب بر آورد	درجه آزادی	F-value	p-value	خطای استاندارد
x_1	۰/۶۸	۱	۱/۷۹	۰/۲۹۳۲	۰/۵۱
x_2	۲/۴۷	۱	۶/۴۸	۰/۰۲۴۴	۰/۵۱
x_3	۱/۴۳	۱	۳۸/۴۹	> 0.0001	۰/۵۱
x_1x_3	-۲/۹۲	۱	۱۲/۵۶	۰/۰۰۳۶	۰/۶۷
x_2x_3	۱/۳۰	۱	۱۲/۵۶	۰/۰۰۳۶	۰/۶۷
x_1^2	-۰/۸۵	۱	۰/۶۳	۰/۴۴۳۴	۰/۵۰
x_2^2	-۴/۱۹	۱	۰/۶۳	۰/۴۴۳۴	۰/۵۰
x_3^2	-۲/۵۸	۱	۲۱/۱۶	۰/۰۰۰۵	۰/۵۰

x_1 : غلظت قلیا (درصد)، x_2 : دمای استخراج (سانتیگراد)، x_3 : زمان استخراج (دقیقه)

جدول ۵: نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس دمای هیستریزس

منبع تغییرات	جمع مربعات	مربع میانگین	درجه آزادی	F-value	p-value
مدل رگرسیون	۲۰۲/۱۵	۳۳/۶۹	۶	۱۳/۵۶	> 0.0001
باقیمانده	۳۲/۳۰	۲/۴۸	۱۳		
عدم برازش	۱۱/۱۱	۱/۳۹	۸	۰/۳۳	۰/۹۲۱۹
خطای خالص	۲۱/۱۹	۴/۲۴	۵		
Corr total	۲۳۴/۴۶	-	۱۹		

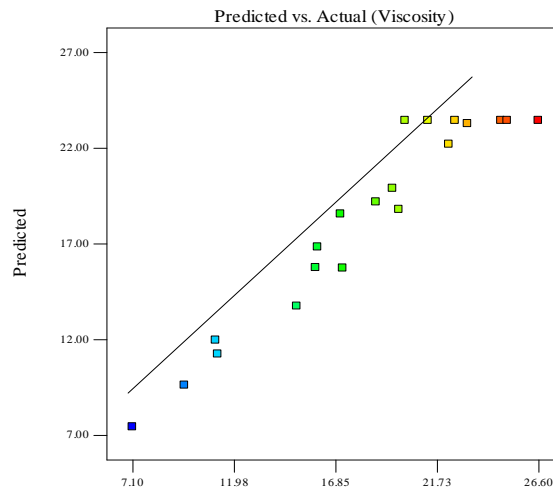
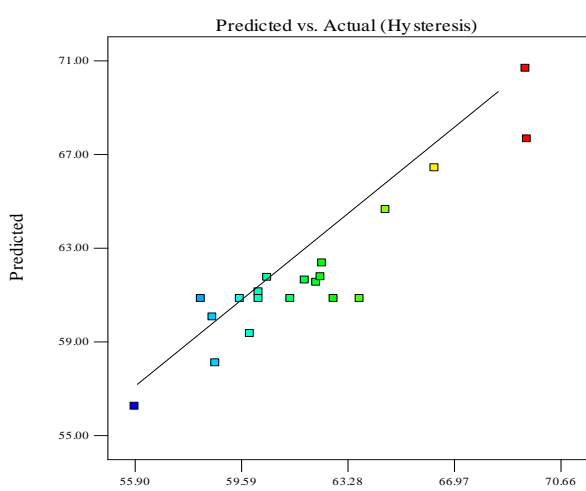
جدول ۶: آنالیز آماری فاکتورهای دخیل در مدل هیستریزس

فاکتور	ضریب بر آورد	درجه آزادی	F-value	p-value	خطای استاندارد
x_1	-۰/۴۷	۱	۱/۲۰	۰/۲۹۳۲	۰/۴۳
x_2	۱/۰۹	۱	۶/۴۸	۰/۰۲۴۴	۰/۴۳
x_3	۲/۶۵	۱	۳۸/۴۹	> 0.0001	۰/۴۳
x_1x_2	۱/۹۸	۱	۱۲/۵۶	۰/۰۰۳۶	۰/۵۶
x_2^2	-۰/۳۳	۱	۰/۶۳	۰/۴۴۳۴	۰/۴۱
x_3^2	۱/۹۰	۱	۲۱/۱۶	۰/۰۰۰۵	۰/۴۱

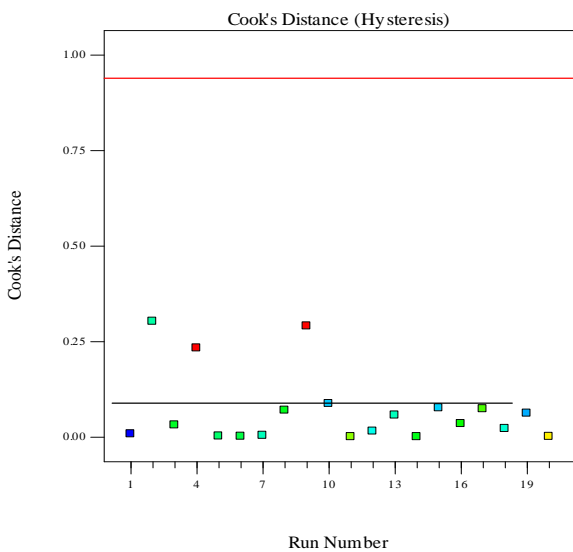
x_1 : غلظت قلیا (درصد)، x_2 : دمای استخراج (سانتیگراد)، x_3 : زمان استخراج (دقیقه)

جدول ۷: مقادیر ضرایب تبیین و سایر ضرایب برای ویسکوزیته و دمای هیستریزیس

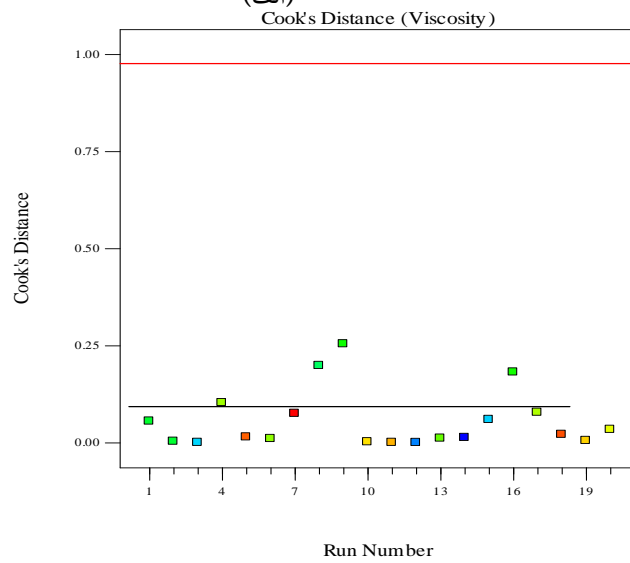
ضرایب	ویسکوزیته	هیستریزیس	ضرایب	ویسکوزیته	هیستریزیس
R-Squared	۰/۹۲۹۹	۰/۸۶۲۲	Std. Dev.	۱/۸۹	۱/۵۸
Adj R-Squared	۰/۸۷۹۰	۰/۷۹۸۶	Mean	۱۸/۲۳	۶۱/۹۱
Pred R-Squared	۰/۸۳۳۸	۰/۷۰۶۴	C.V	۱۰/۳۷	۲/۵۵
Adeq Precision	۱۲/۶۲۶	۱۵/۴۷۰	PRESS	۹۳/۲۱	۶۸/۸۴



Actual (ب)



Actual (الف)



(د)

(ج)

شکل ۱: پلات‌های Residual مدل‌های ویسکوزیته و دمای هیستریزیس ژل آگار، مقادیر واقعی بر حسب پیش‌بینی‌ها: الف) ویسکوزیته، ب) دمای هیستریزیس، فاصله Cook بر حسب آزمایش‌ها: ج) ویسکوزیته، د) دمای هیستریزیس

وجود پیش‌فرآوری این پارامتر بسیار افزایش یافت و در محدوده ۲۶/۶-۷/۱ cP قرار داشت.

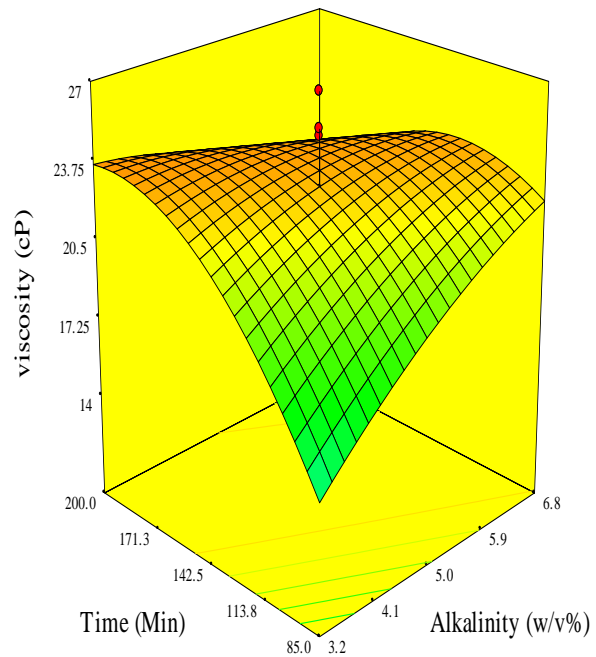
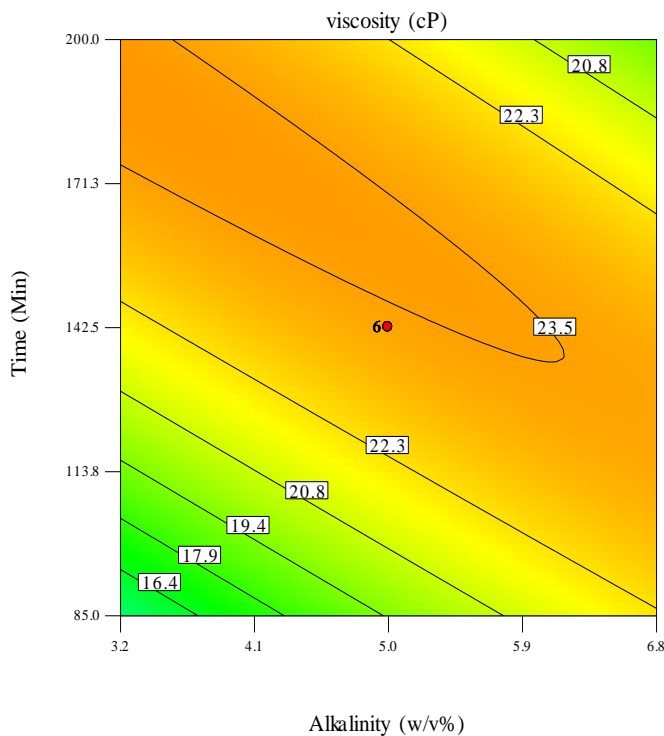
در بین اثرات متقابل متغیرهای ورودی، اثر همزمان، غلظت قلیا و زمان استخراج معنادار بوده‌اند که نمودارهای ذیل (شکل ۲) نمایان‌گر این همزمانی می‌باشند. به گونه‌ای که همزمان با افزایش غلظت قلیا و زمان استخراج، ویسکوزیته محلول افزایش می‌یابد، بنابراین اثر مثبت بر همکنش این دو متغیر مفروض می‌شود. بر اساس گراف‌ها، بیشترین مقدار ویسکوزیته در نقاط میانی طرح آزمایشات بوده و بعد از این نقاط، با افزایش این همزمانی، یک شیب نزولی ویسکوزیته ایجاد می‌گردد.

در پایان پس از بررسی خصوصیات آماری مدل انتخاب شده، تجزیه و تحلیل رگرسیون چند گانه صورت پذیرفت و مدل ریاضی چند جمله‌ای^۹ برای ویسکوزیته (Y_1) و دمای هیستریزس (Y_2) البته با مقادیر کد شده به صورت ذیل به دست آمد:

$$Y_1 = 23/43 + 0/68 x_1 + 2/47 x_2 + 1/43 x_3 - 2/92 x_1 x_2 + 1/30 x_2 x_3 - 0/85 x_1^2 - 4/19 x_2^2 - 2/58 x_3^2$$

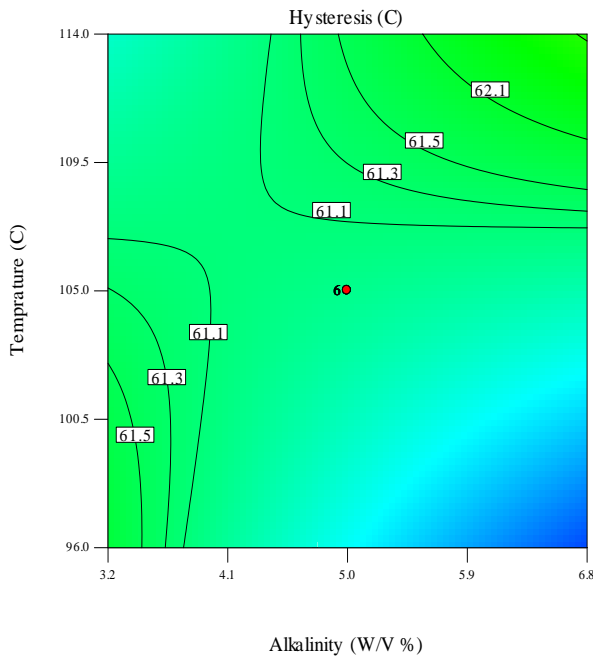
$$Y_2 = 60/83 - 0/47 x_1 + 1/09 x_2 + 2/65 x_3 + 1/98 x_1 x_2 - 0/33 x_2^2 + 1/90 x_3^2$$

با انجام طرح آزمایشات، ویسکوزیته آگار برای نمونه بومی (بدون پیش‌فرآوری) $5/4 \pm 0/72$ cP به دست آمد، اما با



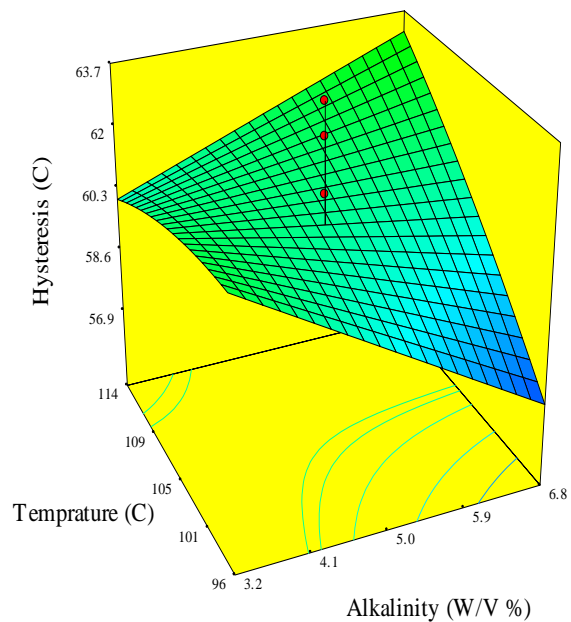
شکل ۲: نمودار کانتور و سه بعدی اثرات همزمان غلظت قلیا و زمان استخراج بر ویسکوزیته آگار

می‌دهند، به نحوی که همزمان با افزایش دما و غلظت قلیا این پاسخ کاهش می‌یابد، اما پس از دمای 10.8°C با ادامه این روند، هیستریزیس ژل آگار سیر نزولی پیدا می‌کند.



دمای هیستریزیس ژل آگار از نمونه بومی (بدون پیش-فرآوری) $59.5 \pm 0.112^{\circ}\text{C}$ به دست آمد، اما با وجود پیش‌فرآوری این پارامتر بسیار افزایش یافت و در محدوده $55.9-69.5^{\circ}\text{C}$ قرار داشت.

اشکال کانتور و سه بعدی اثرات همزمان دما و غلظت قلیا را بر روند دمای هیستریزیس ژل آگار نشان



شکل ۳: نمودار کانتور و سه بعدی اثرات همزمان غلظت قلیا و دمای استخراج بر دمای هیستریزیس آگار

را به اثبات رساند. از طرفی هر چه تفاوت بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی مدل کمتر باشد، تناسب مدل برای پیش‌بینی بهتر می‌باشد. همانگونه که در شکل ۱ و همچنین جدول ۲ ارائه شده است، همگنی مقادیر واقعی بر حسب مقادیر پیش‌بینی برای ویسکوزیته و دمای هیستریزیس مشهود است و اختلاف مقادیر بسیار ناچیز می‌باشد.

بر اساس نتایج، آگار استحصال با شرایط تیمار یافته، ویسکوزیته بهتری را نسبت به نمونه‌ی بدون پیش‌فرآوری از خود نشان داده است. محدوده ویسکوزیته آگار در طرح آزمایشات نسبت به ویسکوزیته نمونه‌ی بدون پیش‌فرآوری بسیار متغیر بودند، بنابراین وجود این محدوده و تغییرات می‌تواند ناشی از متغیرهای ورودی و شرایط استخراج

بحث

وجود مقادیر p -value کمتر از 0.05 برای مدل رگرسیونی و بیشتر از 0.05 برای عدم برازش حاکی از معناداری و کارایی مدل برای ویسکوزیته و دمای هیستریزیس می‌باشد. مقادیر موجود برای ضرایب تبیین R^2 برای هر دو متغیر، نشان از مطلوبیت آن بوده، چرا که برای داده‌هایی با ماهیت شیمیایی، مقدار بیشتر از 0.8 مطلوب است (Sousa et al., 2010). ضرایب تبیین تطابق یافته و پیش‌بینی شده برای هر متغیر، حاکی از تطابق منطقی بین این دو ضریب برای هر دو متغیر بوده و همچنین می‌توان به توانمندی مدل در پیش‌بینی مقادیر پاسخ اشاره داشت. از طرف دیگر نیز مقادیر Adequate precision که برای هر دو متغیر بالاتر از 4 بود مطلوبیت بیشتر مدل

داروسازی اتحادیه آمریکا (USP)^{۱۰} دمای تشکیل ژل آگار باید در محدوده بین ۴۳-۳۴ °C (Li et al., 2008) و نقطه ذوب بالاتر از ۸۵ °C باشد (Orduña-Rojas et al., 2008 a, b)، لذا شاید بتوان میزان حداقل دمای هیستریزس کاربردی در صنعت را ۴۲ °C دانست. تغییرات موجود در گرافهای اثرات همزمان دما و غلظت قلیا بر دمای هیستریزس ژل را می‌توان به خاطر هیدرولیز گروه-های سولفات دانست، چرا که پیش‌فرآوری با قلیا در دماهای بالا منجر به حذف این گروه‌ها گردیده و به تبع آن مقدار دمای هیستریزس نیز افزایش می‌یابد (Dea & Morrison, 1975). چرا که عموماً حضور گروه‌های سولفات درون زنجیره‌ی پلیمری منجر به کاهش خصوصیات ژلی می‌شود (Souza et al., 2012). از طرف دیگر بر اساس مطالعات، پلی‌ساکاریدها حاوی باندهای هیدروژنی درون مولکولی می‌باشند که می‌توانند در اثر حرارت ملایم شکسته شده و منجر به تغییر ساختار گردند. لذا شاید این موضوع بتواند کاهش اولیه دمای هیستریزس ژل آگار را توجیه نماید (Kumar & Fotedar, 2009). مقدار هیستریزس ژل آگار در شرایط متفاوت استخراج برای آگاروفیت‌هایی چون *Curdia angustata* بین ۴۸/۵-۵۱ °C، *Curdia obesa* بین ۷۳-۷۴ °C (Falshaw et al., 1998) و *Gracilaria vermiculophylla* بین ۴۳/۶-۴۸/۳ °C (Sousa et al., 2010) متغیر بودند. عموماً دمای هیستریزس ژل متأثر از اختلاف نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل می‌باشد، بر اساس مطالعات محققان صرف نظر از نوع گونه و شرایط آزمایش، همزمان با افزایش میزان متوکسیل، دمای تشکیل ژل نیز افزایش می‌یابد (Kumar & Fotedar, 2009). از طرف دیگر وزن مولکولی نیز در نوسانات نقطه ذوب تأثیر گذار می‌باشد، چرا که کاهش وزن مولکولی از تشکیل تعاملات پایدارتر درون توالی ژل خودداری نموده که نتیجتاً کاهش نقطه ذوب را در بر دارد (Rodríguez et al., 2009).

تعیین تیمار بهینه و تست تائیدی

باشد (Kumar & Fotedar, 2009). عموماً ویسکوزیته بالا از غلظت‌های قلیا و زمان استخراج بالاتر می‌تواند ناشی از حذف سولفات استر در کربن ۶ (C-6) گالاکتوز و افزایش میزان ۶,۳ انیدریت گالاکتوز باشد که در نتیجه آن، بهبود خواص ژله‌ای حاصل می‌شود (Fotedar, 2009). این پروسه ممکن است در نقاط انتهایی محدوده، عملکرد متفاوتی داشته باشد که علت آن احتمالاً تغییر در ساختار و تسریع تجزیه زنجیره پلیمری آگار منجر به این روند شده است. در گزارش Pereira-Pacheco در سال ۲۰۰۸، برای آگاروفیت *Hydropuntia cornea* تنها متغیر معنادار در ویسکوزیته آگار را زمان استخراج دانستند در صورتی که در این مطالعه زمان و دمای استخراج متغیرهای معنادار بر ویسکوزیته بودند. با توجه به شرایط آزمایش محدوده ویسکوزیته برای سایر آگاروفیت‌های دیگری چون *Gracilaria eucheumatoides* بین cP ۱۴/۵-۱ (Romero et al., 2008)، برای *Hydropuntia cornea* بین cP ۳/۸-۹۱/۵ (Pereira-Pacheco et al., 2007) و برای آگاروفیت *Gracilaria tenuistipitata* در شرایط بدون پیش‌فرآوری نیز ویسکوزیته محلول cP ۱۴ (Montano et al., 1999) گزارش شده است. البته در این مطالعه مقایسه ویسکوزیته تا حدی مشکل می‌باشد چرا که در بعضی از گزارش‌ها، غلظت محلول آگار مشخص نبوده و یا شرایط آزمایش (شماره اسپیندال، تعداد دور در دقیقه) متفاوت بوده است. بنابراین صرف نظر از شرایط آزمایش و نوع گونه جلبکی، مطالعات نشان می‌دهد، شرایط تأثیر گذار بر وزن مولکولی بیوپلیمر نیز می‌تواند بر ویسکوزیته موثر باشد، چرا که ویسکوزیته ظاهری محلول بیوپلیمر، بازتاب وزن مولکولی و طول زنجیره مولکولی نیز می‌باشد (Romero et al., 2008).

با توجه به جدول ۲ می‌توان به بالاتر بودن مقادیر دمای هیستریزس ژل در نمونه پیش‌فرآوری نسبت به نمونه بومی (بدون پیش‌فرآوری) پی‌برد که این محدوده وسیع و متنوع دمای هیستریزس نیز می‌تواند ناشی از تأثیر متغیرهای استخراج و شرایط آزمایش باشد (Kumar & Fotedar, 2009). بر اساس استاندارد

^{۱۰} United States Pharmacopeia

شدند. در پایان شرایط بهینه برای غلظت قلیا، دما و زمان استخراج به ترتیب مقادیر ۳/۲٪، ۱۱۰°C و ۲۰۰ دقیقه به دست آمد. مطابقت مقادیر واقعی و پیشنهادی مدل حاصل از این متغیرها با یکدیگر قابل توجه بود که در جدول ۸ نشان داده شده است. با توجه به این که مقدار Sig. مشاهده شده از سطح معنی‌داری (۰/۰۵) بزرگتر است، بنابراین تفاوت معنی‌داری بین مقدار واقعی با مقدار حاصل از پیش بینی مدل وجود ندارد.

به منظور بهینه‌سازی، در ابتدا برای هر متغیر و پاسخ، بیشینه و یا کمینه آن با یک ضریب اهمیتی مشخص گردید. برای متغیر غلظت قلیا به دلیل تاثیر در بهبود خواص کیفی آگار و مسائل زیست محیطی با اهمیت ۵ کمینه گردید. دما و زمان استخراج به دلیل مسائل اقتصادی و اهمیت آن در پروسه استخراج در همان محدوده آزمایش تعریف شدند. ویسکوزیته و دمای هیستریزس ژل محصول نیز با ضریب اهمیت ۵ بیشینه

جدول ۸: مقایسه مقادیر پیش بینی مدل و واقعی ویسکوزیته و دمای هیستریزس

غلظت قلیا (%)	دما (سانتیگراد)	زمان (دقیقه)	پیش بینی مدل	مقدار واقعی	p-value
۳/۲	۱۱۰	۲۰۰	۲۴/۷	۲۴/۴±۰/۲۵	۰/۳۵۵
			۶۵	۶۴/۴۴±۰/۴۴	۰/۱۷۵

Arvizu-Higuera, D.L., Rodríguez-Montesinos, Y.E., Murillo-Álvarez, J.I., Murillo-Álvarez, j., Muñoz Ochoa, M. and Hernández-Carmona, G., 2008. Effect of alkali treatment time and extraction time on agar from *Gracilaria vermiculophylla*. Journal of Applied Phycology, 20: 515-519.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, S.L. and Escaleira, L.A., 2008. Review: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76: 965-977.

Bixler, H.J. and Porse, H., 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. Journal of Applied Phycology, 23: 321-335.

Dea, I.C.M. and Morrison, A., 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans. Advances in

میانگین ± اشتباه معیار (Mean ± Standard Error of) (Mean; n=3)

بنابراین بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، ویسکوزیته و دمای هیستریزس ژل آگار استحصالی از آگاروفیت *Gp. persica* به مقدار وسیعی تحت شرایط متغیرهای پیش‌فرآوری و استخراج قرار دارند. بهینه‌سازی این شرایط امری حائز اهمیت بوده و روش سطح پاسخ نیز روشی مناسب برای این مهم می‌باشد.

تشکر و قدردانی

شایسته است از مجموعه دوستان عزیز در بندر کلاهی جهت همکاری در تهیه نمونه جلبک پرورشی و کارشناس گرامی در آزمایشگاه فرآوری آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین مهندس یوسفی، مهندس دانشی و مهندس عبداللهی بسیار سپاسگزاری گردد.

منابع

Armisen, R., 1995. World-wide use and importance of *Gracilaria*. Journal of Applied Phycology, 7: 231-243.

- Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 32: 241–312.
- Dean, A. and Voss, D., 1999.** Design and Analysis of Experiments. Springer-Verlag, New York. 742p.
- Falshaw, R., Furneaux, R.H. and Stevenson, D.E., 1998.** Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdia* (Gracilariaceae, Rhodophyta). Carbohydrate Research, 308: 107-115.
- Foegeding, E.A., 2007.** Rheology and sensory texture of biopolymer gels. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 12: 242–250.
- Freile-Pelegrín, Y. and Murano, E., 2005.** Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatan Peninsula. Bioresource Technology, 96: 295-302.
- Freile-Pelegrín, Y. and Robledo, D., 1997b.** Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan Mexico. Journal of Applied Phycology, 9: 533-539.
- Kumar, V. and Fotedar, R., 2009.** Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, & Kraft, 1994). Carbohydrate Polymers, 78: 813-819.
- Li, H., Yu, X., Jin, Y., Zhang, W. and Liu., 2008.** Development of an ecofriendly agar extraction technique from the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis*. Bioresource Technology, 99: 3301–3305.
- Marinho-Soriano, E. and Bourret, E., 2003.** Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). Bioresource Technology, 90: 329-333.
- Mukhopadhyay, S. and Khuri, A.I., 2010.** Advanced Review: Response surface methodology, John Wiley and Sons, Inc 2: 128-149.
- Montano, N.E., Villanueva, R.D. and Romero, J.B., 1999.** Chemical characteristics and gelling properties of agar from two Philippine *Gracilaria* spp. (Gracilariales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology, 11: 27–34.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.C., 2002.** Response surface methodology: process and product optimization using designed experiment. A Wiley Interscience Publication. 690p.
- Orduña-Rojas, J., Suárez-Castro, R., López-Alvaréz, E.S., Ríosmena-Rodríguez, R., Pacheco-Ruiz, I., Zertuche-González, J.A. and Meling-López, A.E., 2008a.** Agar properties of two species of Gracilariaceae from the Gulf of California, Mexico. Journal of Applied Phycology, 20: 169–175.
- Orduña-Rojas, J., Suárez-Castro, R., López-Alvaréz, E. S., Ríosmena-Rodríguez, R., Pacheco-Ruiz, I., Zertuche-González J.A. and Meling-López A.E., 2008b.** Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria longissima* and *Gracilaria vermiculophylla* from the Gulf of California, Mexico. Ciencias Marinas, 34 (4): 503–511.
- Pereira-Pacheco, F., Robledo, D., Rodríguez-Carvajal, L. and Pelegrín, F., 2007.** Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from

- Yucatan, Mexico. *Bioresource Technology*, 98: 1278-1284.
- Prasad, K., Siddhanta, A.K., Ganesan, M., Ramavat, B.K., Jha, B. and Ghosh, P. K., 2007.** Agars of *Gelidiella acerosa* of west and southeast coasts of India. *Bioresource Technology*, 98: 1907–1915.
- Rodríguez, M.C., Matulewicz, M.C., Nosedá, M.D., Ducatti, D.R.B. and Leonardi, P.L., 2009.** Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and physical properties. *Bioresource Technology*, 100: 1435–1441.
- Romero, J.B., Villanueva, R.D. and Montaña, M.E., 2008.** Stability of agar in the seaweed *Gracilaria eucheumatoides* (Gracilariales, Rhodophyta) during postharvest storage. *Bioresource Technology*, 99: 8151–8155.
- Sousa, A. M. M., Alves, V. D., Morais, S., Delerue-Matos, C. and Gonçalves, M. P., 2010.** Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: Evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 101: 3258–3267.
- Souza, H.K.S., Sousa, A.M.M., Gómezb, J. and Goncalves, M.P., 2012.** Complexation of WPI and microwave-assisted extracted agars with different physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 89: 1073–1080.
- Venugopal, V., 2009.** Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York. 527p.
- Vergara-Rodarte, M.A., Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Y.E., Arvizu-Higuera, D.L., Riosmena-Rodríguez, R. and Murillo-Álvarez, J.I., 2010.** Seasonal variation of agar from *Gracilaria vermiculophylla*, effect of alkali treatment time, and stability of its Colagar. *Journal of Applied Phycology*, 22: 753-759.

**Assessment of extraction variables on agar gelling properties from cultural alga
(*Gracilariopsis persica*) by RSM**

Entesarian M.R.¹; Rezaei M.^{1*}; Motamedzadegan A.²; Daryaei A.³

*Rezaei_ma@modares.ac.ir

1- Department of Seafood Science and Technology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor

2- Department of Food Science and Technology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari

3-Islamic Azad University Bandar Abbas

Received: February 2015

Accepted: October 2015

Keywords: Agar, Viscosity, Hysteresis temperature, Response Surface Methodology, *Gracilariopsis persica*

Abstract

In this present, response surface methodology was used to investigate the procedure of agar gelling properties from *Gracilariopsis persica* agarophyte and optimization them formulation. Base on result, three independent variables - alkalinity concentration (2-8%), extraction temperature (90-120°C) and extraction time (45-240 minutes) - in five levels on viscosity and hysteresis temperature were determined that effects of extraction time and temperature on viscosity and hysteresis temperature were significant ($p < 0.05$). optimum conditions based on the highest viscosity and hysteresis temperature to be for alkalinity concentration, temperature and time extraction 3.2%, 110 °C and 200 minutes, respectively. predicted value were earned 24.7 cP and 65 °C for viscosity and hysteresis temperature, respectively, that were very close to the predicted data and were not statistically different ($p > 0.05$).

* Corresponding author