

بهینه سازی شرایط استخراج پکتین با روش غرقابی از تفاله شاه توت

وحید مسیبی^۱، زهرا امام جمعه^{۲*}، فریده طباطبائی یزدی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استاد و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- دانشیار و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱)

چکیده

پکتین پلی ساکاریدی است که به صورت گسترده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی به عنوان قوام دهنده، ژله ای کننده و امولسیون کننده مصرف می شود. امروزه در مقیاس صنعتی پکتین از تفاله سیب یا پوست مرکبات تولید می شود، با این وجود جستجوی منابع جدید به منظور تولید پکتین ها یا خواص مورد انتظار دیگر از آن همچنان ادامه دارد. همراه با افزایش تولید و فرآوری میوه های خانواده توت، مقادیر قابل ملاحظه ای فرآورده های جانبی بوجود می آید. تفاله، فرآورده جانبی اصلی حاصل از فرآیندهای عصاره گیری از میوه های خانواده توت و منبع غنی فیتوکمیکال ها (آنتی اکسیدانها و رنگدانه های طبیعی)، پکتین و فیبرهاست. در این پژوهش پکتین تفاله شاه توت با استفاده از روش غرقابی (اصطلاحاً "روش مرسوم") و تحت شرایط اسیدی (pH=۲)، استخراج شد و تاثیر پارامترهای فرآیند یعنی زمان استخراج (۳/۵-۱/۵ ساعت)، درجه حرارت استخراج (۷۰-۹۰°C) و نسبت نمونه به حلال (۰/۰۶۶ g/mL) -۰/۰۳۳ بر روی مقادیر راندمان، درجه استری شدن (DE) و محتوای گالاکتورونیک اسید (GalA) پکتین مورد بررسی قرار گرفت. روش سطح پاسخ (RSM) با طرح مرکب مرکزی (CCD) به منظور طراحی آزمایشات و بهینه سازی شرایط استخراج پکتین به کار گرفته شد. بسته به شرایط مختلف به کار رفته در استخراج، مقادیر راندمان، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین های بدست آمده در محدوده به ترتیب ۶/۳۹-۱۰/۳۳-۱۰/۳۳ (براساس وزن خشک)، ۵۱/۷۸-۷۴/۴۲-۲۳/۹۱٪ و ۳۴/۷۳-۲۳/۹۱٪ تغییر پیدا کرد. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که اثر هر سه پارامتر مورد بررسی بر روی راندمان پکتین معنی دار بود (p<۰/۰۱). مدت زمان ۱/۵ ساعت، درجه حرارت ۹۰°C و نسبت نمونه به حلال ۰/۰۳۳ g/mL به عنوان شرایط بهینه استخراج انتخاب شد. تحت این شرایط ۹/۸۵٪ پکتین با مقادیر درجه استری شدن و درصد گالاکتورونیک اسید به ترتیب ۶۸٪ و ۳۲/۵٪، استخراج شد.

کلید واژگان: پکتین، تفاله شاه توت، استخراج، بهینه سازی، روش سطح پاسخ

* مسئول مکاتبات: emamj@ut.ac.ir

۱- مقدمه

پکتین پلی ساکارید پیچیده‌ای است که در دیواره سلولی نخستین بافت های گیاهی و در لایه ای بین سلولی که لاملای میانی^۱ نامیده می‌شود، یافت می‌شود و عمدتاً^۱ از یک زنجیره خطی حاوی واحدهای D-گالاکتورونیک اسید که با پیوندهای ۴→۱- α به هم متصل شده اند، تشکیل شده است. به این زنجیره اصلی زنجیره جانبی قندهای ختایی مانند ال-رامنوز، ال-آرابینوز و D-گالاکتوز متصل شده است [۱]. در صنایع غذایی پکتین به عنوان عامل ژله ای کننده مخصوصاً^۲ در تولید ژله ها و مرباها به کار برده می شود. پکتین همچنین در پرکننده ها، داروها، شیرینی جات، به عنوان تثبیت کننده در آبمیوه ها و نوشیدنی های شیری و همچنین به عنوان فیبر رژیمی نیز مورد استفاده قرار می گیرد [۲]. در حال حاضر تقریباً^۳ تمام پکتین های تجاری از پوست مرکبات یا گوشت سیب، که هردو فرآورده های جانبی حاصل از فرآیند تولید آبمیوه هستند، تولید می شود [۳]. با این وجود جستجوی منابع جدید پکتین به منظور دستیابی به نوع و خواص مورد انتظار دیگر از آن همچنان ادامه دارد [۴].

همراه با افزایش تولید و فرآوری میوه های خانواده توت مقادیر قابل ملاحظه ای از فرآورده های جانبی بوجود می آید. تفاله، فرآورده جانبی اصلی فرآوری میوه های خانواده توت است. تفاله میوه های خانواده توت شامل دانه ها، پوست و گاهی اوقات ساقه می شود و به طور سنتی به عنوان غذای حیوانی و یا کود استفاده می شود. با این وجود زمانیکه به عنوان غذای حیوانی استفاده شود قابلیت هضم آن بدلیل حضور مقادیر بالای پلی فنول های پلی اوریک پایین است، به دلیل اینکه این پلی فنلها جلوی فعالیت آنزیم های تخریب کننده سلول و آنزیم های تجزیه کننده پروتئین را می گیرد و نیز مانع رشد برخی از باکتری های شکمبه می شود. تخلیه تفاله به خاک یا محل های دفن زباله نیز مشکل فزاینده ای را بوجود آورده است زیرا ماده گیاهی معمولاً^۴ مستعد

1. Middle lamella

فساد میکروبی است و دفع آن می تواند مشکلات زیست محیطی جدی را موجب شود و از اینرو ممکن است با محدودیت های قانونی مواجه شود. بنابراین با افزایش تولید و فرآوری میوه های خانواده توت، جستجو برای محصولات با ارزش افزوده از تفاله این میوه ها امری ضروری است [۵]. تفاله میوه های خانواده توت منبع غنی فیتوکمیکال ها (آنتی اکسیدانها و رنگدانه های طبیعی)، پکتین و فیبرهاست و با توجه به مواد مغذی گوناگون و فراوان آن، سوبسترای عالی برای فرآیند تخمیر حالت جامد می باشد. با وجود آنکه میزان پکتین این تفاله ها در مقایسه با دیگر میوه های غنی از پکتین تا حدودی کمتر است ولی برای استحصال پکتین مناسب هستند [۴].

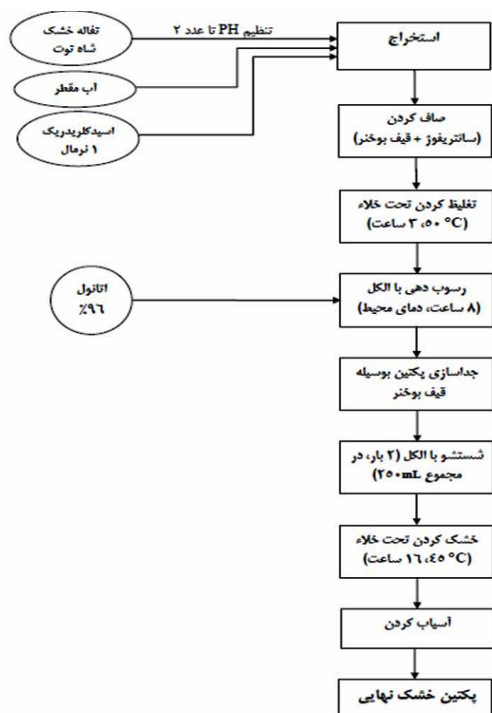
با استناد به آمار سازمان خوار بار و کشاورزی سازمان ملل متحد (فائو) در سال ۲۰۱۲ میلادی ایران با تولید در مجموع ۱۸۲۰۰۰ تن انواع میوه های خانواده توت (Berries ness) رتبه نخست تولید این محصولات را در دنیا به خود اختصاص داده است [۶]. با این وجود میزان تولید شاه توت در آمارها به تفکیک مشخص نشده است که دلیل آن احتمالاً^۷ میزان کم تولید این محصول بوده است. شاه توت (*Morus nigra.L*) که خاستگاه آن از ایران است به خاطر میوه اش در نواحی جنوبی اروپا و آسیای جنوبی شرقی کاشته می‌شود و مهمترین گونه توت در کشورهای مدیترانه ای است [۷]. از شاه توت به صورت عمده برای تولید مارمالاد، آب و نوشیدنی الکلی شاه توت، رنگ های طبیعی و نیز به صورت منجمد در بستنی سازی استفاده می شود. فصل برداشت شاه توت کوتاه و حدود ۲ ماه است که پس از آن می تواند در یخچال و حداکثر تا ۶ هفته دیگر نگهداری شود. از اینرو میوه تازه شاه توت به خاطر ساختار ظریف و پایداری کم آن در شرایط انبارمانی، به ژله یا آب شاه توت فرآوری می شود [۸].

هدف اصلی از این پژوهش بررسی اثر شرایط استخراج با روش غرقابی (استخراج با محلول اسیدی بر روی همزن مغناطیسی) یعنی زمان و درجه حرارت استخراج، و نسبت نمونه به حلال بر روی راندمان، درجه استری شدن (DE) و درصد گالاکتورونیک اسید (GalA) پکتین از تفاله شاه توت بود که برای این منظور از

متا هیدروکسی دی فنیل^۲ و D-گالاکتورونیک اسید استاندارد نیز از شرکت سیگما آلدریج^۳ آمریکا خریداری شد.

۲-۳- استخراج و جداسازی پکتین

استخراج و جداسازی پکتین مطابق روش باقریان و همکاران (۲۰۱۱) و با یک سری تغییرات انجام شد که مراحل آن به صورت شماتیک در فلوجارت شکل شماره ۱ نشان داده شده است [۱۰].



شکل ۱ مراحل استخراج و جداسازی پکتین

۴۰ گرم از پودر تفاله شاه توت خشک و آسیاب شده توزین و به یک ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری و یا ۲۰۰۰ میلی لیتری (برای تیمارهای آزمایشی که حجم کل مخلوط (حلال+ تفاله) از ۱۰۰۰ میلی لیتر بیشتر می شد) منتقل شد و آب مقطر دیونیزه (حلال) در مقادیر مورد نیاز برای دستیابی به نسبت نمونه به حلال مشخص شده در هر تیمار به ارلن اضافه شد. pH محلول در تمام تیمارهای استخراجی ثابت بود و با استفاده از محلول ۱

روش سطح پاسخ (RSM) با طرح مرکب مرکزی قابل چرخش (CCRD) استفاده شد و برای هر پاسخی یک مدل چند جمله ای درجه دوم ایجاد شود. تکنیک بهینه سازی در نهایت کمک کرد که یک شرایط بهینه برای استخراج پکتین از تفاله شاه توت بدست آید.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- آماده سازی پودر تفاله شاه توت

میوه شاه توت مورد استفاده در این تحقیق به صورت منجمد از یک بازار محلی میوه در کرج تهیه شد. میوه ها بلافاصله یخ زدائی شده و با استفاده از یک آبمیوه گیر پرس دستی عصاره گیری شدند. تفاله مجدداً از یک صافی پارچه ای دولایه عبور داده شد تا حد امکان عصاره بیشتری از آن جدا شود. تفاله خیس سپس در ظروف پلاستیکی پلی اتیلنی 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 خلأ Townson Croydon, England (& Mercer) و درجه حرارت 50°C تا رسیدن به محتوای رطوبت نهایی ۶٪ (اندازه گیری شده بر اساس روش امران و همکاران، ۲۰۱۰) [۹]. در مدت حدود ۲۴ ساعت خشک شد. تفاله خشک شده با استفاده از یک خردکن آزمایشگاهی خرد شد و به صورت پودر در آمد. پودر تفاله شاه توت بدست آمده در ظروف پلی اتیلنی پر، و تا زمان استخراج پکتین در یخچال (4°C) نگهداری شد.

۲-۲- مواد شیمیایی و معرف ها

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق شامل اسید کلریدریک، اسید سولفوریک غلیظ، سود، و تترابورات سدیم، گرید آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک آلمان خریداری شد. اتانول ۹۶٪ از شرکت جهان شیمی (تهران) خریداری شد. معرف

2. Meta-hydroxydiphenyl
3. Sigma-Aldrich

لیتری منتقل و با ۲/۵ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ خیسانده شد. سپس ۲۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه ۴۰°C اضافه و به مدت ۲ ساعت هم زده شد تا پکتین کاملاً حل شود و کلوخه ای از آن باقی نماند. محلول حاصل در حضور ۶ قطره معرف فنل فتالین با سود ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ تیترا شد و حجم سود مصرف شده به عنوان تیترا خشتی شدن (V₁) یادداشت شد. به محلول پلی گالاتورونیک اسید خشتی شده در اولین تیتراسیون، ۱۰ میلی لیتر سود ۰/۱ نرمال اضافه و ارلن درپوش گذاری شد و محتویات آن به مدت ۲ ساعت دیگر بر روی همزن مغناطیسی به آرامی هم زده شد تا گروههای استری شده پکتین صابونی شود. ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک به محتویات ارلن اضافه شد و اسید اضافی مجدداً با سود ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ تیترا شد و حجم مصرفی تحت عنوان تیترا صابونی شدن (V₂) یادداشت شد. درجه استری شدن پکتین از رابطه زیر محاسبه شد:

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

۴-۲-۲- درصد گالاتورونیک اسید (Gala)

درصد گالاتورونیک اسید پکتین با روش رنگ سنجی با معرف متا هیدروکسی دی فنیل و بوسیله اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش- مرئی سسیل (Cecil, CE2502، انگلستان) اندازه گیری شد [۱۲]. ۰/۰۵ گرم از نمونه پکتین های استخراج شده در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری با آب مقطر دیونیزه به حجم رسانده شد. مخلوط بر روی همزن مغناطیسی همزده شده تا پکتین حل شده و کاملاً همگن شود. ۱ میلی لیتر از این محلول رقیق حاوی پکتین به ۳ لوله آزمایش شیشه ای (دو لوله برای اندازه گیری جذب نمونه پکتین و یکی برای اندازه گیری جذب نمونه شاهد) که در داخل مخلوط آب یخ غوطه ور بودند، منتقل شد. سپس ۶ میلی لیتر از محلول تترا بورات سدیم که از قبل آماده شده بود، به هر لوله آزمایش اضافه و لوله ورتکس شدند تا محتویات آنها کاملاً مخلوط شود. محتویات داخل لوله ها به مدت دقیقاً ۶ دقیقه در حمام آب جوش ۱۰۰°C حرارت داده شد و پس از این مدت

نرمال هیدروکلریک اسید بر روی عدد ۲ تنظیم شد. سپس فرآیند استخراج بر روی همزن مغناطیسی و در مدت زمان ها و درجه حرارت های مشخص شده مطابق طرح آزمایشی (جدول ۲) انجام گرفت. مخلوط در طول زمان استخراج به صورت ملایم هم می خورد و درجه حرارت آن با ترمومتر دستی کنترل می شد. پس از پایان استخراج، عصاره بدست آمده تا درجه حرارت محیط سرد و ابتدا توسط سانتریفوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه صاف شد. مایع شفاف روئی مجدداً یک بار نیز با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) صاف شد تا هرگونه ذرات ریز معلق باقیمانده در آن کاملاً جداسازی شود. در مرحله بعد عصاره شفاف بدست آمده تحت شرایط خلاء و در درجه حرارت ۵۰°C تا یک پنجم حجم اولیه تغلیظ شد. pH عصاره غلیظ شده سپس با سود ۲ نرمال بر روی عدد ۳٫۵ تنظیم شد و به میزان ۱/۵ برابر حجم عصاره به آن اتانول ۹۶٪ اضافه شد و به مدت ۸ ساعت در درجه حرارت محیط باقی ماند تا پکتین رسوب کند. پکتین رسوب داده شده ۲ بار با اتانول ۹۶٪ تازه شستشو داده شد و سپس با کمک قیف بوختر و کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جداسازی شد. در نهایت پکتین خیس بدست آمده تحت شرایط خلاء و در درجه حرارت ۴۵°C تا رسیدن به وزن ثابت، خشک شد. پکتین خشک بدست آمده با یک خرد کن آزمایشگاهی خرد شد و به صورت پودر درآمد. پودر پکتین از یک غربال آزمایشگاهی با مش ۸۰ عبور داده شد و برای انجام آزمایشات بعدی در یخچال (۴°C) نگهداری شد. راندمان پکتین از تقسیم وزن پکتین خشک بدست آمده بر وزن ماده خشک تفاله به کار رفته برای استخراج بدست آمد.

۴-۲-۴- آنالیز شیمیایی پکتین های استخراج شده

۴-۲-۱- درجه استری شدن (DE)

اندازه گیری درجه استری شدن (DE) پکتین بر اساس روش پتانسیومتری بوچک و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد [۱۱]. ۰/۲ گرم پکتین خشک و آسیاب شده شده به یک ارلن ۲۵۰ میلی

۲-۵- طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

روش آماری سطح پاسخ (RSM) به منظور طراحی آزمایشات و بهینه سازی شرایط استخراج پکتین از تفاله خشک شده شاه توت مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور طرح مورد نظر با استفاده از نرم افزار Design expert (نسخه ۸،۰،۷،۱، trial) و در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) با ۶ تکرار در نقطه مرکزی (برای برآورد خطای آزمایشی)، مقدار $\alpha = 1/68$ و در مجموع ۲۰ تیمار ریخته شد. اثرات سه متغیر مستقل فرآیند به نام های زمان استخراج، درجه حرارت استخراج و نسبت نمونه به حلال هریک در ۳ سطح بر روی مقادیر متغیرهای وابسته (پاسخ ها) راندمان، درجه استری شدن و درصد گالاکتورونیک اسید پکتین مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای مستقل مورد آزمایش و محدوده آنها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ متغیرهای مستقل فرآیند و سطوح مربوط به آنها در طرح مرکب مرکزی (CCD)

سطوح هر متغیر			متغیرهای مستقل
+۱	۰	-۱	
۳/۵	۲/۵	۱/۵	A: مدت زمان استخراج (ساعت)
۹۰	۸۰	۷۰	B: درجه حرارت استخراج (°C)
۰/۰۶۶	۰/۰۵	۰/۰۳۳	C: نسبت نمونه به حلال (گرم بر میلی لیتر)

بالاترین نسبت نمونه به حلال یعنی تیمار شماره ۱۴ بدست آمد. مدل چند جمله ای درجه دوم زیر برای پیش بینی مقدار راندمان پکتین (PY) براساس مقادیر متغیرهای مستقل زمان (A)، و درجه حرارت (B) استخراج و نسبت نمونه به حلال (C) بدست آمد:

$$PY = 7.67 + 0.21A + 0.37B - 0.94C - 0.39AB + 0.11AC - 0.24BC + 0.18A^2 + 0.15B^2 + 0.36C^2 \quad (1)$$

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) انجام شده بر روی این مدل چند جمله ای درجه دوم در جدول شماره ۳ نشان می دهد که مدل پیش بینی شده معنی دار ($p < 0.0001$) و آزمون عدم برازش آن غیر معنی دار است ($p = 0.0934 > 0.05$).

مخلوط فوراً تا درجه حرارت اتاق سرد شد. به دو لوله آزمایش حاوی نمونه پکتین ۰/۱ میلی لیتر معرف متا هیدروکسی دی فنیل و به لوله آزمایش حاوی نمونه شاهد ۰/۱ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۰/۵ درصد اضافه و محتویات هر لوله کاملاً مخلوط شد. لوله های آزمایش به مدت به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق باقی ماندند و سپس جذب محتویات هر لوله در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. منحنی کالیبراسیون با اندازه گیری جذب محلولهای استاندارد گالاکتورونیک اسید در محدوده ۱۰۰-۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر در ۵۲۰ نانومتر تهیه و غلظت گالاکتورونیک اسید در هر نمونه پکتین با استفاده معادله رگرسیون خطی منحنی کالیبراسیون و براساس وزن خشک پکتین، محاسبه شد.

۳- نتایج و بحث

نتایج بدست آمده در ۲۰ تیمار استخراج پکتین با روش غرقابی در جدول شماره ۲ آمده است.

۳-۱- راندمان پکتین

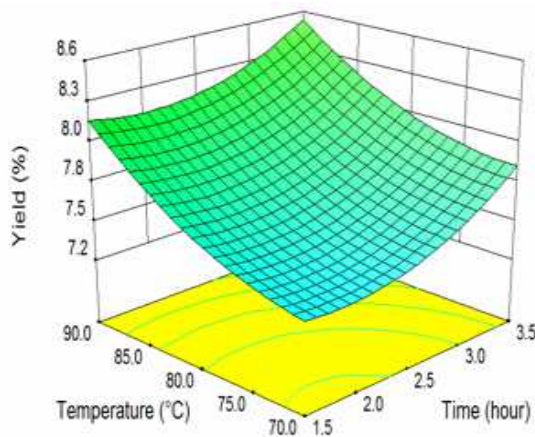
بر اساس نتایج نشان داده شده در جدول ۲، مقادیر راندمان پکتین از ۶/۳۹ تا ۱۰/۳۳٪ بر اساس ماده خشک متغیر بود که بیشترین راندمان در شدیدترین شرایط استخراج یعنی در مقادیر زمان، درجه حرارت و نسبت نمونه به حلال به ترتیب ۳/۵ ساعت، ۹۰°C و ۰/۰۳۳ g/ml (تیمار شماره ۴) و کمترین راندمان در

نمونه به حلال، اثرات درجه دوم زمان استخراج و نسبت نمونه به حلال و نیز اثر متقابل بین درجه حرارت و نسبت نمونه به حلال بر روی راندمان پکتین معنی دار است ($p < 0/05$).

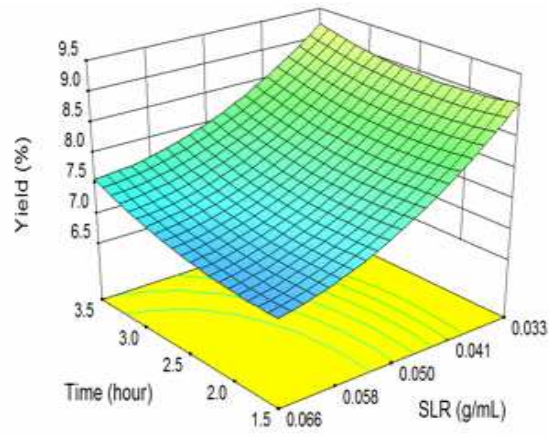
۳-۱-۱- تاثیر شرایط استخراج بر روی راندمان پکتین

منحنی های سطح پاسخ نشان دهنده اثر همزمان دو متغیر مستقل فرآیند در سطح مرکزی متغیر سوم بر روی راندمان پکتین استخراج شده در شکل ۲ نمایش داده شده است.

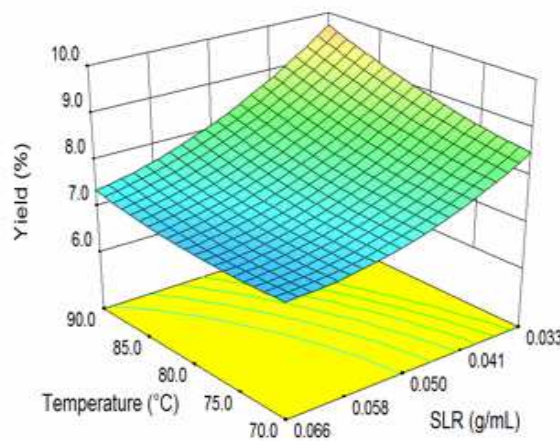
ضریب تبیین بالا ($R^2 = 0/9691$) حاکی از برازش خوب مدل پیش بینی شده به داده های آزمایشی است. همچنین مقدار ضریب تبیین اصلاح شده بالا ($R^2_{adjusted} = 0/9343$) نیز مناسب بودن مدل را برای پیش بینی داده های آزمایشی نشان می دهد. مقدار ضریب تغییرات خیلی کم ($0/26\%$) نیز به وضوح نشان می دهد که داده های آزمایشی بدست آمده از تکرارپذیری و قابلیت اطمینان بالایی برخوردار است. بر طبق نتایج آنالیز واریانس، اثرات خطی (اصلی) هر سه متغیر زمان، درجه حرارت و نسبت



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۲ نمایش سه بعدی اثرات همزمان الف) زمان و درجه حرارت استخراج ب) زمان استخراج و نسبت نمونه به حلال (SLR) و ج) درجه حرارت استخراج و نسبت نمونه به حلال بر روی راندمان پکتین (در هر نمودار سطح متغیر سوم در حد مرکزی آن ثابت نگه داشته شده است).

مقایسه با نسبت های کم، با افزایش درجه حرارت راندمان پکتین با شیب ملایم تری افزایش پیدا کرده است.

۳-۲- درجه استری شدن پکتین (DE)

درجه استری شدن پکتین استخراج شده از تفاله شاه توت در شرایط مختلف استخراج از ۵۱/۷۸ تا ۷۴/۴٪ متغیر بود، از اینرو پکتین تفاله شاه توت در دسته پکتین های متوکسیل بالا (۵۰٪) قرار می گیرد.

یک مدل رگرسیونی چند جمله ای درجه دوم بر روی مقادیر داده های آزمایشی بدست آمده برای درجه استری شدن پکتین برازش شد تا مقادیر درجه استری شدن (DE) را بر حسب متغیرهای مستقل فرآیند، پیش بینی کند. مدل بدست آمده را می توان با معادله زیر نشان داد:

$$DE = 60.41 - 1.06A - 1.72B - 5.82C + 0.20AB - 1.27BC + 0.12A^2 + 1.67B^2 + 1.70 C^2 - 2.10AC$$

در این معادله A، B و C به ترتیب مقادیر کد گذاری شده زمان استخراج، درجه حرارت استخراج و نسبت نمونه به حلال است. تجزیه و تحلیل واریانس بر روی این مدل چند جمله ای درجه دوم انجام شد که نتایج آن در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می شود مدل پیش بینی شده معنی دار ($p=0/0007$) و آزمون عدم برازش آن غیر معنی دار ($p=0/1754$) شده است. مقدار ضریب تبیین این مدل ۰/۹۳۶۸ و ضریب تبیین اصلاح شده آن ۰/۸۶۵۸ بدست آمد که نشان دهنده برازش خوب مدل به داده های آزمایشی است. اثرات خطی درجه حرارت استخراج (B) و نسبت نمونه به حلال (C) و نیز اثر متقابل بین زمان استخراج و نسبت نمونه به حلال (AC) عبارت های معنی دار در این مدل بودند ($p<0/05$). سایر عبارات ها تاثیر معنی داری بر روی درجه استری شدن پکتین استخراج شده نشان ندادند ($p>0/10$).

هدف اصلی از نمودار سطح پاسخ ردیابی هرچه موثرتر مقادیر بهینه متغیرهای مستقل آزمایشی است به طوریکه مقدار پاسخ بیشترین مقدار شود. با تجزیه و تحلیل این نمودارها می توان بهترین محدوده را برای پاسخ برآورد کرد [۱۳]. همانطور که مشاهده می شود با افزایش زمان و درجه حرارت استخراج و کاهش نسبت نمونه به حلال راندمان پکتین افزایش پیدا کرده است که با روند گزارش شده توسط سهیر، النواوی و شهاتا [۱۴] و یئو، شی و لانگرایش [۱۵] در شرایط مشابه استخراج مطابقت دارد. افزایش راندمان با افزایش زمان استخراج شاید به دلیل زمان مورد نیاز برای رهایش کامل پکتین به درون محلول اسیدی باشد. به عبارت دیگر حلال بایستی اول به درون بافت تفاله خشک نفوذ کرده، پکتین را در خود حل کند و متعاقباً آن را به بیرون از بافت تفاله تراوش کند. افزایش درجه حرارت باعث افزایش حلالیت پکتین استخراج شده و در نتیجه باعث افزایش سرعت استخراج می شود [۱۶]. همچنین با افزایش درجه حرارت ضریب نفوذ افزایش یافته و از اینرو سرعت انتشار تقویت خواهد شد. همانطور که در شکل ۲ ("ب" و "ج") و نیز در معادله مدل (معادله ۱) مشاهده می شود نقش اصلی را در استخراج پکتین از تفاله شاه توت، نسبت نمونه به حلال بر عهده دارد که ضریب رگرسیونی بالاتر آن (-۰/۹۴) نیز گویای این واقعیت است. استفاده از مقادیر زیاد حلال (آب) منجر به کاهش گرانیوی محلول شده و از اینرو حلال به صورت آزادانه به گردش در آمده و تماس آن با ماده استخراج شونده موثرتر انجام می شود. همچنین در نسبت حلال به نمونه بالاتر، گرادیان یا شیب غلظت (بین ماده جامد و حلال) و در نتیجه سرعت استخراج بیشتر خواهد بود [۱۷].

همانطور که در شکل ۲ (ج) دیده می شود درجه حرارت استخراج و نسبت نمونه به حلال بر روی راندمان پکتین متقابلاً اثر کرده اند به گونه ای که در نسبت های زیاد نمونه به حلال در

جدول ۳ نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شده بر روی مدل چند جمله ای درجه دوم

منبع تغییر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار p
راندمان					
مدل	۱۷/۳۹	۹	۱/۹۳	۲۷/۸۶	<۰/۰۰۰۱
A- زمان استخراج	۰/۶۰	۱	۰/۶۰	۸/۶۱	۰/۰۱۸۹
B- درجه حرارت استخراج	۱/۸۸	۱	۱/۸۸	۲۷/۱۳	۰/۰۰۰۸
C- نسبت نمونه به حلال	۱۲/۰۲	۱	۱۲/۰۲	۱۷۳/۳۸	<۰/۰۰۰۱
AB	۰/۰۱۲	۱	۰/۰۱۲	۰/۱۷	۰/۶۸۸۲
AC	۰/۱۰	۱	۰/۱۰	۱/۴۹	۰/۲۵۶۶
BC	۰/۴۸	۱	۰/۴۸	۶/۸۵	۰/۰۳۰۷
A ²	۰/۴۶	۱	۰/۴۶	۶/۵۸	۰/۰۳۳۴
B ²	۰/۳۳	۱	۰/۳۳	۴/۷۷	۰/۰۶۰۶
C ²	۱/۸۵	۱	۱/۸۵	۲۶/۶۶	۰/۰۰۰۹
باقیمانده	۰/۵۵	۸	۰/۰۶۹		
عدم برازش مدل	۰/۵۰	۵	۰/۱۰	۵/۶۰	۰/۰۹۳۴
خطای محض	۰/۰۵۴	۳	۰/۰۱۸		
درجه استری شدن (DE)					
مدل	۶۴۱/۸۳	۹	۷۱/۳۱	۱۳/۱۹	۰/۰۰۰۷
A- زمان استخراج	۱۵/۳۶	۱	۱۵/۳۶	۲/۸۴	۰/۱۳۰۵
B- درجه حرارت استخراج	۴۰/۶۲	۱	۴۰/۶۲	۷/۵۱	۰/۰۲۵۴
C- نسبت نمونه به حلال	۴۶۲/۱۳	۱	۴۶۲/۱۳	۸۵/۴۵	<۰/۰۰۰۱
AB	۰/۳۳	۱	۰/۳۳	۰/۶۱	۰/۸۱۱۷
AC	۳۵/۳۶	۱	۳۵/۳۶	۶/۵۴	۰/۰۳۳۸
BC	۱۲/۹۰	۱	۱۲/۹۰	۲/۳۹	۰/۱۶۱۰
A ²	۰/۲۰	۱	۰/۲۰	۰/۰۳۸	۰/۸۵۰۸
B ²	۴۰/۳۰	۱	۴۰/۳۰	۷/۴۵	۰/۰۲۵۹
C ²	۴۱/۷۶	۱	۴۱/۷۶	۷/۷۲	۰/۰۲۴۰
باقیمانده	۴۳/۲۷	۸	۵/۴۱		
عدم برازش مدل	۳۶/۶۶	۵	۷/۳۳	۳/۳۳	۰/۱۷۵۴
خطای محض	۶/۶۰	۳	۲/۲۰		
درصد گالاکتورونیک اسید (Gala)					
مدل	۹۱/۶۴	۹	۱۰/۱۸	۹/۸۴	۰/۰۰۱۹
A- زمان استخراج	۲۴/۷۷	۱	۲۴/۷۷	۲۳/۹۴	۰/۰۰۱۲
B- درجه حرارت استخراج	۰/۳۹	۱	۰/۳۹	۰/۳۷	۰/۵۵۸۱
C- نسبت نمونه به حلال	۱۲/۲۶	۱	۱۲/۲۶	۱۱/۸۵	۰/۰۰۸۸
AB	۲۵/۱۰	۱	۲۵/۱۰	۲۴/۲۵	۰/۰۰۱۲
AC	۱۷/۳۲	۱	۱۷/۳۲	۱۶/۷۳	۰/۰۰۳۵
BC	۲/۱۳	۱	۲/۱۳	۲/۰۶	۰/۱۸۹۱
A ²	۰/۰۰۴۷۵	۱	۰/۰۰۴۷۵	۰/۰۰۴۵۹	۰/۹۴۷۶
B ²	۴/۷۵	۱	۴/۷۵	۴/۵۸	۰/۰۶۴۷
C ²	۳/۹۵	۱	۳/۹۵	۳/۸۲	۰/۰۸۶۵
باقیمانده	۸/۲۸	۸	۱/۰۳		
عدم برازش مدل	۶/۳۳	۵	۱/۲۷	۱/۹۵	۰/۳۰۸۹
خطای محض	۱/۹۵	۳	۰/۶۵		

$R^2 = 0.9691$
 $R^2_{adj} = 0.9343$
 $CV = 3.126$

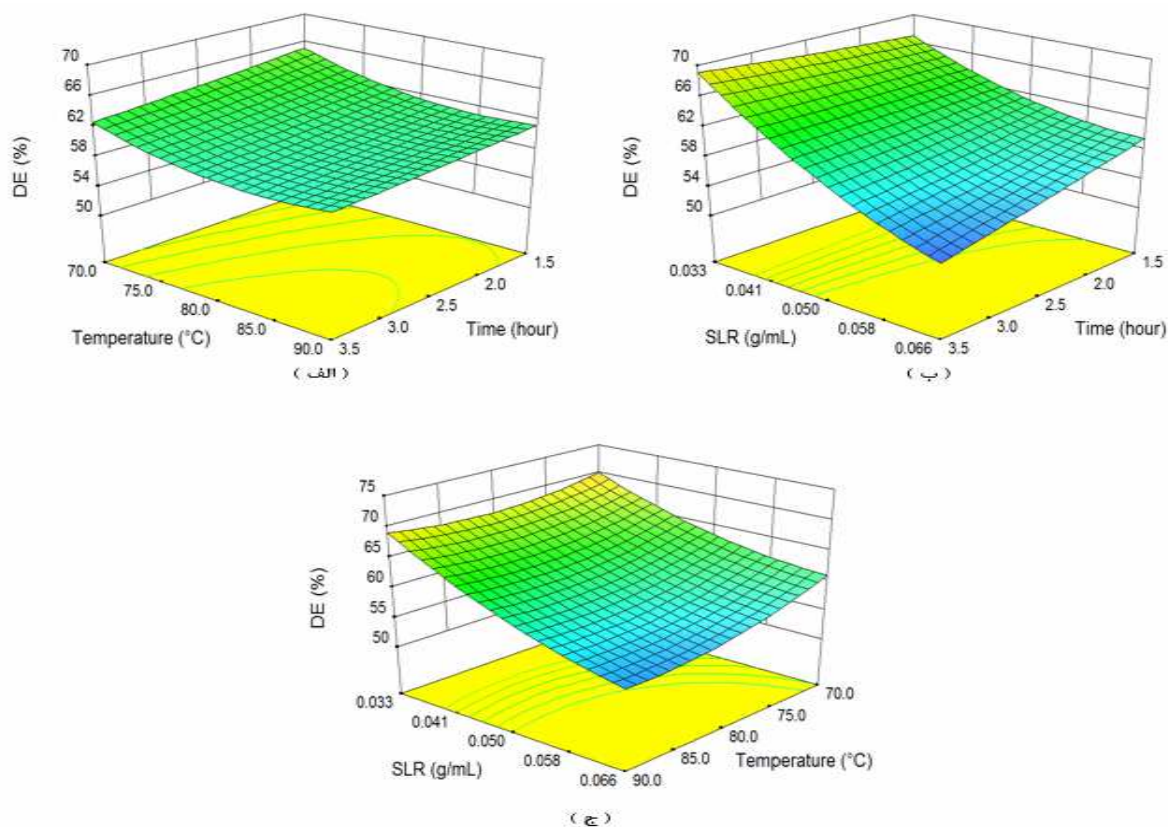
$R^2 = 0.9338$
 $R^2_{adj} = 0.8658$
 $CV = 3.71$

$R^2 = 0.9171$
 $R^2_{adj} = 0.8139$
 $CV = 3.77$

۳-۲-۱- تاثیر شرایط استخراج بر روی درجه استری

شدن پکتین

نمایش سه بعدی اثر همزمان متغیرهای مستقل فرآیند را بر روی درجه استری شدن پکتین استخراج شده می توان در منحنی های سطح پاسخ شکل ۳ (الف-ج) مشاهده کرد.



شکل ۳ نمایش سه بعدی اثرات همزمان الف) زمان و درجه حرارت استخراج ب) زمان استخراج و نسبت نمونه به حلال (SLR) و ج) درجه حرارت استخراج و نسبت نمونه به حلال بر روی درجه استری شدن پکتین (DE) (در هر نمودار سطح متغیر سوم در حد مرکزی آن ثابت نگه داشته شده است).

درجه استری شدن پکتین نشان نداد حال آنکه استخراج با اسید سیتریک (در pH های ۲/۵ و ۴/۰) و آب، درجه استری شدن پکتین را به صورت معناداری کاهش داد. افزایش درجه حرارت استخراج نیز از ۷۰ تا ۸۵°C منجر به کاهش درجه استری شدن شده است در حالیکه افزایش بیشتر آن تاثیری بر روی درجه استری شدن نداشته است. چنان و چو تاثیر درجه حرارت استخراج و نسبت نمونه به حلال بر روی درجه استری شدن پکتین را در شرایط مشابه استخراج غیر معنی دار گزارش کرده بودند [۲۱]. در درجه حرارت های بالا، زمانهای طولانی تر و pH

مطابق شکل ۳ (الف) افزایش زمان استخراج تاثیر ناچیزی بر روی درجه استری شدن پکتین داشته است که با روند گزارش شده توسط پوستلامایر و همکاران [۱۸] و یاپو و همکاران [۱۹] در شرایط مشابه استخراج همخوانی دارد. با این حال ونگ وای و همکاران [۲۰] کاهش معنی دار درجه استری شدن با افزایش زمان استخراج را در شرایط مشابه استخراج گزارش کرده بودند. چنان و چو [۲۱] نیز مشاهده کردند که افزایش زمان از ۱/۵ تا ۳ ساعت در استخراج پکتین از پوست کاکائو با هیدرو کلریک اسید (pH محلول استخراجی ۲/۵ یا ۴/۰) تاثیر معنی داری را بر روی

شدن پکتین همانطور که از شکل ۲ (ب و ج) و ضریب رگرسیونی عبارت C در معادله مدل (معادله ۲) می توان مشاهده کرد نسبت نمونه به حلال داشته است به طوریکه در تمام شرایط استخراج با کاهش نسبت نمونه به حلال (یا افزایش نسبت حلال به نمونه) درجه استری شدن پکتین به صورت خطی افزایش پیدا کرده است که با نتایج گزارش شده توسط محققان دیگر در شرایط مشابه استخراج هم خوانی دارد [۱۹ و ۲۳].

پایین تر راندمان پکتین استخراج شده افزایش می یابد، اگرچه دپلمریزه شدن و استرزدایی پکتین نیز تحت این شرایط به سهولت پیش می رود [۲۲]. در این پژوهش کمترین درجه استری شدن پکتین (۵۱/۷۸٪) مطابق جدول ۲ (تیمار ۸) در شدیدترین شرایط استخراج یعنی زمان، درجه حرارت و نسبت نمونه حلال به ترتیب ۳/۵ ساعت، ۹۰°C و ۰/۰۶۶ گرم بر میلی لیتر بدست آمده است. البته بیشترین تاثیر را بر روی درجه استری

جدول ۲ نتایج بدست آمده در استخراج پکتین از تفاله شاه توت

تیمار	زمان استخراج (ساعت)	درجه حرارت استخراج (°C)	نسبت نمونه به حلال (گرم بر میلی لیتر)	راندمان پکتین (%)	درجه استری شدن (%)	محتوای گالاکتورونیک اسید (%)
۱	۱/۵	۷۰	۰/۰۳۳	۸/۹۰	۷۰/۹۴	۲۹/۱۴
۲	۳/۵	۷۰	۰/۰۳۳	۹/۱۱	۷۱/۱۵	۳۰/۴۷
۳	۱/۵	۹۰	۰/۰۳۳	۹/۹۲	۶۸/۷۱	۳۰/۷۹
۴	۳/۵	۹۰	۰/۰۳۳	۱۰/۳۳	۷۴/۴۲	۲۸/۶۶
۵	۱/۵	۷۰	۰/۰۶۶	۷/۲۰	۶۱/۷۹	۲۳/۹۱
۶	۳/۵	۷۰	۰/۰۶۶	۸/۲۲	۵۸/۲۸	۳۴/۷۳
۷	۱/۵	۹۰	۰/۰۶۶	۷/۶۰	۵۹/۱۷	۲۷/۱۲
۸	۳/۵	۹۰	۰/۰۶۶	۸/۱۱	۵۱/۷۸	۲۷/۲۵
۹	۰/۸۲	۸۰	۰/۰۵۰	۷/۳۶	۶۲/۳۵	۲۷/۴۲
۱۰	۴/۱۸	۸۰	۰/۰۵۰	۷/۷۸	۵۶/۷۰	۳۲/۳۱
۱۱	۲/۵	۶۳/۱۸	۰/۰۵۰	۶/۷۴	۶۸/۵۲	۲۷/۵۵
۱۲	۲/۵	۹۶/۸۲	۰/۰۵۰	۸/۲۵	۵۹/۳۲	۲۸/۸۳
۱۳	۲/۵	۸۰	۰/۰۲۲	۹/۷۷	۷۱/۵۱	۳۳/۳۵
۱۴	۲/۵	۸۰	۰/۰۷۷	۶/۳۹	۵۶/۵۰	۲۹/۲۴
۱۵	۲/۵	۸۰	۰/۰۵۰	۷/۷۴	۶۰/۷۱	۳۱/۷۰
۱۶	۲/۵	۸۰	۰/۰۵۰	۸/۰۳	۶۰/۶۰	۳۰/۳۴
۱۷	۲/۵	۸۰	۰/۰۵۰	۷/۶۵	۶۲/۲۴	۲۷/۲۵
۱۸	۲/۵	۸۰	۰/۰۵۰	۷/۷۱	۵۹/۹۵	۲۸/۶۲
۱۹	۲/۵	۸۰	۰/۰۵۰	۷/۳۸	۵۸/۰۸	۲۹/۲۰
۲۰	۲/۵	۸۰	۰/۰۵۰	۷/۵۲	۶۰/۹۰	۲۸/۸۰

۸۰°C پی برد. در نسبت های بالای نمونه به حلال (۰/۰۶۶) درجه استری شدن پکتین با افزایش زمان استخراج کاهش یافته است، در حالیکه در نسبت های نمونه به حلال کمتر از ۰/۰۵ تا

با مشاهده منحنی سطح پاسخ شکل ۳ (ب) می توان به وجود یک اثر متقابل ضعیف بین نسبت نمونه به حلال و زمان استخراج بر روی درجه استری شدن پکتین و در درجه حرارت ثابت

مقدار ضریب تبیین این مدل ۰/۸۹۵۸، ضریب تبیین اصلاح شده آن ۰/۸۲۲۸ و مقدار ضریب تغییرات (CV) آن ۳/۴۷٪ بود. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که زمان استخراج و نسبت نمونه به حلال فاکتورهایی هستند که بیشترین تاثیر معنی دار را بر روی درصد گالاکتورونیک اسید پکتین دارند. تاثیر درجه حرارت استخراج بر روی درصد گالاکتورونیک اسید پکتین بی معنی بود ($P=0/5560 > 0/05$). اثرات درجه دوم هیچ کدام از متغیرها نیز در سطح آماری ۹۵٪ بر روی درصد گالاکتورونیک اسید پکتین معنی دار نشد.

۳-۳-۱- اثر شرایط استخراج بر روی درصد گالاکتورونیک اسید پکتین

منحنی های سطح پاسخ در شکل ۴ (الف-ج) اثر متغیرهای مستقل فرآیند استخراج را بر روی درصد گالاکتورونیک اسید پکتین نشان می دهد.

با افزایش زمان استخراج درصد گالاکتورونیک اسید پکتین به صورت خطی افزایش پیدا کرده است که با روند گزارش شده توسط محققان دیگر از جمله گارنا و همکاران [۲۵]، لیو و همکاران [۲۶] و لیانگ و همکاران [۲۷] در شرایط مشابه استخراج هم خوانی دارد. افزایش درصد گالاکتورونیک اسید یا به عبارت دیگر افزایش خلوص پکتین با افزایش زمان استخراج را می توان به جدا شدن ترکیبات غیر پکتینی نسبت داد [۲۸]. با توجه به اینکه در مرحله استخراج به غیر از پکتین سایر پلی ساکاریدهای دیواره سلولی از جمله سلولز و همی سلولزهایی مانند آرابان ها، گالاکتان ها و گزیلان ها نیز به همراه پکتین و چسبیده به آن استخراج می شوند لذا با گذشت زمان این ترکیبات بیشتر از پکتین جدا شده و متعاقباً در مرحله رسوب دهی با الکل پکتین خالص تری بدست می آید (نسبت پکتین به ترکیبات غیر پکتینی در رسوب کرده افزایش می یابد). دلیل دیگر برای افزایش محتوای گالاکتورونیک اسید با افزایش زمان استخراج به احتمال زیاد افزایش هیدرولیز زنجیره های جانبی قندهای خشتی متعلق به ساختار خود پکتین است [۲۱].

۰/۰۳۳ با طولانی شدن زمان استخراج، مقدار درجه استری شدن ثابت مانده و یا حتی اندکی افزایش یافته است.

۳-۳-۲- محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین

استخراجی

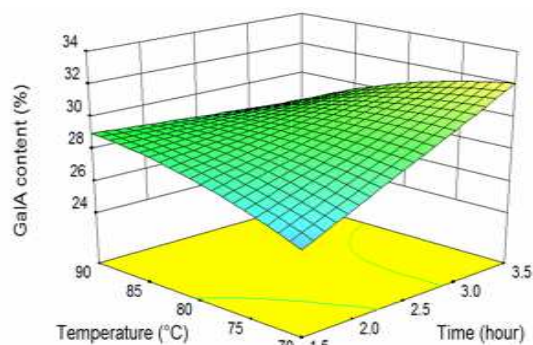
محتوای گالاکتورونیک اسید نشان دهنده خلوص پکتین است و مطابق مجموعه قوانین و مقررات مربوط به مواد شیمیایی و غذایی (FCC^۴) پکتین تجاری باید حداقل حاوی ۶۵٪ گالاکتورونیک اسید باشد. براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش (جدول ۲) محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین های استخراج شده از تفاله شاه توت در شرایط مختلف از ۲۳/۹۱ تا ۳۴/۷۳ درصد بر اساس وزن خشک پکتین متغیر بود که در محدوده درصد گالاکتورونیک اسید گزارش شده برای پکتین استخراج شده از مواد اولیه مختلف (۷۰-۲٪) قرار می گیرد [۲۴].

بلافی-باکو و همکارانش نیز درصد گالاکتورونیک اسید پکتین های استخراجی از تفاله میوه های توتی (انگور فرنگی قرمز و سیاه، تمشک و آقظی) را از ۳۷/۴ تا ۴۹/۷٪ گزارش کرده بودند و دلیل پایین بودن درصد گالاکتورونیک اسید را حضور مونوساکاریدهای دیگری مانند رامنوز، آرابینوز، مانوز، گلوکز و نیز گالاکتوز در پکتین های استخراج شده ذکر کردند [۴].

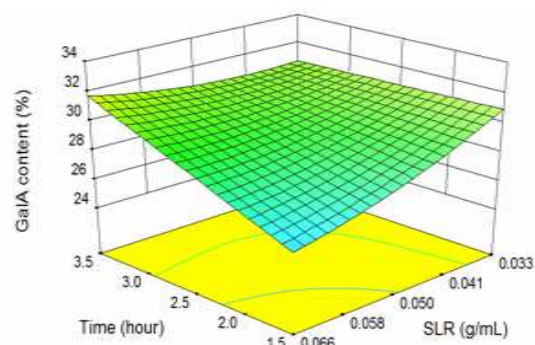
با به کارگیری آنالیز رگرسیونی چند متغیره بر روی داده های آزمایشی، معادله چند جمله ای درجه دوم زیر برای پیش بینی مقادیر درصد گالاکتورونیک اسید (GalA) برحسب مقادیر کدگذاری شده متغیرهای زمان استخراج (A)، درجه حرارت استخراج (B) و نسبت نمونه به حلال (C) بدست آمد.

$$\text{GalA} = 29.33 + 1.35A - 0.17B - 0.95C - 1.77AB + 1.47AC - 0.52BC + 0.018A^2 - 0.57B^2 + 0.52C^2 \quad (1)$$

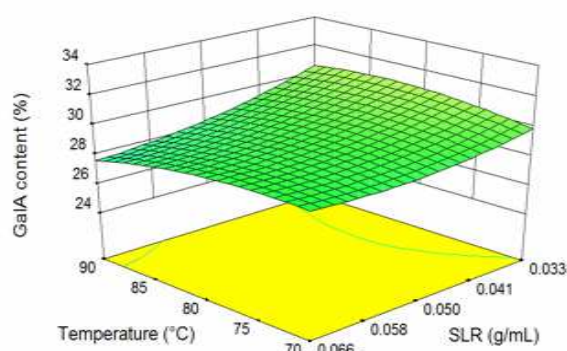
نتایج آنالیز واریانس انجام شده برای این مدل چند جمله ای درجه دوم در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. مطابق این جدول مدل پیش بینی شده معنی دار ($p < 0/001$) و عدم برازش مربوط به آن غیر معنی دار ($p = 0/3280 > 0/05$) است.



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۴ نمایش سه بعدی اثرات همزمان (الف) زمان و درجه حرارت استخراج (ب) زمان استخراج و نسبت نمونه به حلال (SLR) و (ج) درجه حرارت استخراج و نسبت نمونه به حلال بر روی محتوای گالاکتورونیک اسید (GalA) پکتین (در هر نمودار سطح متغیر سوم در حد مرکزی آن ثابت نگه داشته شده است).

شکل با افزایش یک پارامتر در سطح پایین پارامتر دیگر (برای مثال افزایش زمان استخراج در سطح پایین درجه حرارت یعنی 70°C یا افزایش درجه حرارت استخراج در سطح پایین زمان استخراج یعنی $1/5$ ساعت) هر دو منجر به افزایش درصد گالاکتورونیک اسید شده است در حالیکه ترکیب زمان و درجه حرارت بالای استخراج (سطح بالای هر دو متغیر به صورت همزمان) باعث کاهش درصد گالاکتورونیک اسید پکتین شده است. در شرایط ملایم استخراج (ترکیب زمان و درجه حرارت پایین) احتمالاً ترکیبات پلی ساکاریدی غیر پکتینی چسبیده به پکتین که همراه با آن استخراج شده اند هنوز به خوبی از پکتین جدا نشده اند. کاهش خلوص پکتین (درصد گالاکتورونیک اسید) در شرایط شدید استخراج (ترکیب همزمان مدت زمان و درجه حرارت بالا) نیز ممکن است به دلیل تخریب حرارتی پکتین

این زنجیره های جانبی که جزئی از ساختار مولکول پکتین هستند و با پیوند کوالانسی به بخش زنجیره خطی آن متصل شده اند در ناحیه رامنوگالاکتورونان ۱ عمدتاً از آرابینان و گالاکتان تشکیل شده است [۲۹] و به ناحیه رامنو گالاکتورونان ۲ نیز ۴ زنجیره جانبی با ۱۱ نوع قند مختلف استخلاف شده است که از جمله آنها آپیوز، ۲-کتو-۳-داکسی-دی مانو کتولوزونیک می باشد [۳۰]. با طولانی تر شدن زمان استخراج این زنجیره های جانبی بیشتر از پکتین جدا می شوند و از آنجایی که این زنجیره ها به دلیل سبک تر بودن قادر با رسوب با اتانول نیستند، در نتیجه خلوص پکتین رسوب کرده با گذشت زمان افزایش پیدا می کند. شکل ۴ (الف) اثر متقابل درجه حرارت و زمان استخراج را بر روی درصد گالاکتورونیک اسید پکتین در نسبت نمونه به حلال ثابت $0/05$ گرم بر میلی لیتر به وضوح نشان می دهد. مطابق این

برای پکتین بدست آید. از اینرو روش تابع مطلوبیت در فرآیند بهینه سازی برای این منظور انتخاب شد. این تکنیک بهینه سازی عددی نقطه ای را معین می کند که در آن تابع مطلوبیت بیشترین مقدار را داشته باشد [۳۲]. شرایط بهینه استخراج که براساس تکنیک تابع مطلوبیت انتخاب شد عبارت است از: زمان استخراج ۱/۵ ساعت، درجه حرارت استخراج 90°C و نسبت نمونه به حلال ۰/۰۳۳ گرم بر میلی لیتر، که مقدار مطلوبیت در این شرایط ۷۹٪ بود. تحت شرایط بهینه استخراج مقادیر راندمان، درجه استری استری شدن و درصد گالاکتورونیک اسید پکتین به ترتیب ۹۰/۸۵٪، ۶۸٪ و ۳۲/۵٪ پیش بینی شد که با آزمایشات تاییدی انجام شده (۲ بار تکرار، داده ها در اینجا نیامده است) تفاوت معنی داری نشان نداد.

۵- نتیجه گیری

در این پژوهش استخراج پکتین از تفاله شاه توت تحت شرایط مختلف زمان، دما و نسبت نمونه به حلال انجام گرفت. RSM با طرح مرکب مرکزی (۳ فاکتور هر یک در ۳ سطح) به منظور تولید ۳ معادله چند جمله ای درجه دوم که مقادیر راندمان، درجه استری شدن و درصد گالاکتورونیک اسید پکتین را پیش بینی کند، به کار گرفته شد. بر اساس نتایج بدست آمده راندمان پکتین در مجموع از ۶۳/۳۹ تا ۱۰/۳۳٪ بر اساس وزن خشک، درجه استری شدن از ۵۱/۷۸ تا ۷۴/۴۲٪ و درصد گالاکتورونیک اسید از ۲۳/۹۱ تا ۳۴/۷۳٪ در ۲۰ تیمار استخراجی متغیر بود. بیشترین راندمان استخراج پکتین از تفاله شاه توت ۱۰/۳۳٪ بود که در شدیدترین شرایط استخراج یعنی در مدت زمان ۳/۵ ساعت، درجه حرارت 90°C و نسبت نمونه به حلال ۰/۰۳۳ گرم بر میلی لیتر بدست آمد که درجه استری شدن و درصد گالاکتورونیک اسید پکتین در این شرایط به ترتیب ۷۴/۴۲٪ و ۲۸/۶۶٪ بود. براساس نتایج ANOVA نسبت نمونه به حلال مهمترین فاکتور تاثیرگذار برای استخراج پکتین از تفاله شاه توت بود.

استخراج شده باشد که عمدتاً ناشی از مکانیسم دپلمریزه شدن زنجیره گالاکتورونان پکتین (معروف به حذف بتا) است [۲۹]. با هیدرولیز پلیمرهای سنگین مولکول پکتین به پلیمرهای سبک حلالیت پکتین در آب افزایش می یابد، که در این صورت ممکن است جداسازی آن به صورت یک رسوب جامد با افزودن اتانول، سخت تر شود [۳۱].

اثر همزمان مدت زمان استخراج و نسبت نمونه به حلال بر روی درصد گالاکتورونیک اسید پکتین را در درجه حرارت ثابت 80°C می توان در نمودار سه بعدی شکل ۴ (ب) مشاهده کرد. مطابق این شکل در مدت زمانهای استخراج از ۱/۵ تا ۳/۵ ساعت، با کاهش نسبت نمونه به حلال (یا افزایش نسبت حلال به نمونه) از ۰/۰۶۶ تا ۰/۰۳۳ گرم بر میلی لیتر، درصد گالاکتورونیک اسید پکتین در ابتدا با شیب تند افزایش یافته، سپس مقدار آن تقریباً ثابت و در زمان های طولانی استخراج مقدار آن اندکی کاهش یافته است. یعنی زمان استخراج و نسبت نمونه به حلال بر روی درصد گالاکتورونیک اسید متقابل کرده اند و اثر یکی مستقل از دیگری نبوده است. این اثر متقابل همانطور که از نتایج ANOVA (جدول ۳) پیداست، معنی دار است ($p = 0/0035$). به هر حال روند کلی تغییرات درصد گالاکتورونیک اسید با افزایش نسبت نمونه به حلال به صورت کاهش خطی بوده است زیرا ضریب رگرسیونی C در معادله مدل منفی و عبارت درجه دوم آن نیز (C^2) نیز غیر معنی دار شده است ($p > 0/05$ ، $p = 0/0865$). لیو و همکاران [۲۳] و چان و چو [۲۷] نیز قبلاً روند افزایش محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین را با افزایش نسبت حلال به نمونه (کاهش نسبت نمونه به حلال) به ترتیب در محدوده ۲۰-۴۰ و ۱۰-۲۵ گرم بر میلی لیتر در شرایط مشابه استخراج، گزارش کرده بودند.

۴- بهینه سازی شرایط استخراج پکتین از

تفاله شاه توت

هدف از بهینه سازی پیدا کردن شرایطی از استخراج بود که در آن بالاترین راندمان، درجه استری شدن و درصد گالاکتورونیک اسید

- microwave and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit, *Journal of Chemical Engineering and Processing*. 50: 1237-1243.
- [11] Bocek, A.M., Zabivalova, N.M., and Petropavlovskii. (2001). Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 74: 796-799.
- [12] 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.
- [13] Li, D-Q., Jia, X., Weia, Z., & Liua, Z-Y. (2012). Box-Behnken experimental design for investigation of microwave-assisted extracted sugar beet pulp pectin. *Journal of Carbohydrate Polymers*. 88: 342-346.
- [14] Sohair, A., El-Nawawi, S.A., and Shehata, F.R. (1987). Extraction of pectin from egyptian orange peel, factors effecting the extraction. *Journal of Biological Wastes*. 20: 281-290.
- [15] Yeoh, S., Shi, J., Langrish, T.A.G. (2008). Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels, *Journal of Desalination*. 218: 229-237.
- [16] Methacanon, P., Kongsin, J., Gamonpilas, C. 2014. Pomelo (*Citrus maxima*) pectin: Effects of extraction parameters and its properties, *Journal of Food Hydrocolloids*. 35: 383-391.
- [17] Masmoudi, M., Besbes, S., Chaabouni, M., Robert, C., Paquot, M., Blecker, C., et al. (2008). Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology, *Carbohydrate Polymers*. 74: 185-192.
- [18] Postlmayr, H. L., B. S. Luh, et al. (1956). Characterization of Pectin Changes in Freestone and Clingstone Peaches During Ripening and Processing, *Journal of Food Technology*. 10: 618-625.
- [19] Yapo, B.M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., and Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Journal of Food Chemistry*. 100: 1356-1364.
- ۶- منابع
- [1] Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2009). Complex pectins: structure elucidation using enzymes, in pectins and pectinases (eds Visser, J. and Voragen, A.G.J), *Progress in biotechnology* 14, Elsevier Science, Amsterdam. pp3-19.
- [2] Website: <http://en.m.wikipedia.org/wiki/pectin>, visited at 2014/10/03, 19:49:45.
- [3] Thirugnanasambandham, K., Sivakumar, V., Prakash Maran, J. (2014). Process optimization and analysis of microwave assisted extraction of pectin from dragon fruit peel, *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 112: 622-626.
- [4] Belafi-Bako, K., Cserjesi, P., Beszedes, S., Csanadi, Z., Hodur, C., (2012). Berry pectins: microwave-assisted extraction and rheological properties, *Journal of Food Bioprocess Technology*. 5: 1100-1105.
- [5] Zhao, Y. (2007). Berry fruit value-added products for health promotion, Chapter 14: utilization of berry processing by-products, CRC press. pp 388 and 389.
- [6] FAO website: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, visited at 2014/10/08, 10:30 am.
- [7] Ercisli, S., & Orhan, E. (2008). Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*. 116:41-46.
- [8] Perez-Gregorio, M.R., Regueiro, J., Alonso-Gonzalez, E., Pastrana-Castro, L.M., Simal-Gandara, J. (2011). Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.), *LWT-Food Science Technology*. 44: 1793-1801.
- [9] 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] Issue 12. pp 973-980.
- [10] Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A., and Mohtashami, M., (2011). Comparisons between conventional,

- mulberry branch bark, *Journal of Bioresource Technology*. 101: 3268-3273.
- [27] Liang, R-H., Chen, J., Liu, W., Liu, C-M., Yu, W., Yuan, M., Zhou, X-Q. (2012). Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*Ficus pumila* Linn) seeds, *Carbohydrates polymers*. 87: 76-83.
- [28] Constenla, D., and Lozano, J.E. (2003). Kinetic model of pectin demethylation. *Journal of Latin American Applied Research*. 33: 91-96.
- [29] Albersheim P., Neukom H., and Deuel H. (1960). Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 90:46-51.
- [30] O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill A.G., Albersheim, P. (1996). Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester, *Journal of Biological Chemistry*. 271:22923-22930.
- [31] Yujaroen, P., Supjaroenkul, U., and Rungrodnimitchai, S. (2008). Extraction of pectin from sugar palm meat, *Thammasat International Journal of Science and Technology*. 13:44-47.
- [32] Prakash Marana, J., Sivakumara, V., Thirugnanasambandhama, K., Sridharb, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel, *Journal of Carbohydrate Polymers*. 97: 703-709.
- [20] Weng Wai, W., Alkarkhi, A.F.M., Mat Easa, A. 2010. Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design, *Journal of food and bioproducts processing*. 88: 209-214.
- [21] Chan, S-Y., Choo, W-S. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks, *Journal of Food Chemistry*. 141: 3752-3758.
- [22] Imeson, A. (2010). *Food stabilisers, thickeners and gelling agents*, Wiley-BlackWell Publication. pp 240.
- [23] Kulkarni, S.G., and Vijayanand, P. (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.), *Journal of Food Science and Technology*. 43: 1026-1031.
- [24] Tang, P-Y., Kek, T-S., Gan, C-Z., Hee, C-Y., Chong, C-H., and Woo, K-K. (2011). Yield and some chemical properties of pectin extracted from the peels of dragon fruit [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton and Rose], *Journal of Philippine Agricultural Scientist*. 94:307-311.
- [25] Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Cornet, C., Nott, K., Legros, H., et al., (2007), Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol, *Journal of Food Science*. 72:C001-C009.
- [26] Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y., and Yao, J. (2010). Extraction of pectins with different degrees of esterification from

Optimization of extraction conditions of pectin by conventional method from black mulberry pomace

Mosayebi, V. ¹, Emam-Djomeh, Z. ^{2*}, Tabatabaei Yazdi, F. ³

1. M.Sc. Graduate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 93/7/27 Accepted: 94/2/1)

Pectin is a polysaccharide which is extensively used as a thickener, a gelling agent and an emulsifier in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. Nowadays, pectin is commercially produced from citrus peel or apple pomace, however searching for new sources to produce other desired pectins or properties therefrom continues. Along with the increased production and processing of berry crops, considerably higher ratios of by-products arise. Pomace is a primary by-product of the traditional berry fruits juice extraction processes and rich source of phytochemicals (antioxidants and natural pigments), pectin and fibres. In this research, pectin was extracted from black mulberry pomace using soxhlet (the so-called conventional) method under acidic condition (pH=2), and the effect of process parameters namely extraction time (1.5-3.5 h), extraction temperature (70-90 °C), and solid to liquid ratio (0.033-0.066 g/mL) on yield, degree of esterification (DE), and galacturonic acid content (GalA) of pectin were investigated. Response surface methodology (RSM) with a central composite design (CCD) was employed for designing of experiments and optimization of extraction conditions of pectin. Depending on the different conditions applied in the extraction process, the values of yield, degree of esterification and galacturonic acid content of pectin varied from 6.39-10.33% (dry weight basis), 51.78-74.42%, and 23.91-34.73%, respectively. The results of ANOVA showed that the effect of all three investigated extraction parameters was significant on the yield of pectin ($p < 0.01$). The duration of 1.5 h, temperature of 90 °C, and solid/liquid ratio of 0.033 g/mL were selected as optimum extraction conditions. Under this conditions, 9.85% of pectin was extracted with the degree of esterification and galacturonic acid content of 68%, and 32.5%, respectively.

Keywords: Pectin, Black mulberry pomace, Extraction, Optimization, Response surface methodology

* Corresponding author E-mail address: emamj@ut.ac.ir