

بررسی اثر شرایط استخراج بر ویژگی‌های بافتی ژل آگار جلبک پرورشی *Gracilaria persica* به روش RSM

محمد رضا انتصاریان بیدگلی^۱، مسعود رضایی^{۲*}، علی معتمدزادگان^۳، عبدالرسول دریایی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۳- استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- مربی آموزشی، عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس

چکیده

در این پژوهش میزان سختی و پیوستگی ژل آگار از آگاروفیت پرورشی *Gracilaria persica* با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب چرخشی مرکزی (CCRD) بهینه‌سازی شد. نمونه‌های ژل آگار تحت تاثیر سه متغیر مستقل غلظت قلیا (۸-۲ W/V%)، دمای استخراج (۹۰-۱۲۰ °C) و زمان استخراج (۲۴۰-۴۵ دقیقه) در پنج سطح استخراج گردید. نتایج نشان داد تمامی پارامترهای فرآیند تاثیر معناداری بر سختی ژل داشته‌اند ($p < 0.05$). در حالی که زمان استخراج تنها پارامتر معنادار فرآیند بر میزان پیوستگی ژل آگار محسوب گردید. مدل چندجمله‌ای و شرایط بهینه برای بیشترین مقدار سختی و پیوستگی ژل، به ترتیب مقادیر ۳/۲٪، ۱۱۰ °C و ۲۰۰ دقیقه برای متغیرهای غلظت قلیا، دما و زمان استخراج به دست آمد. پاسخ‌های پیش بینی شده برای شرایط استخراج شامل سختی ۱۶/۲۸ N و پیوستگی ۰/۱۵۷ بودند. آزمایشات تاییدی برای مقایسه مقادیر پیش بینی شده و واقعی متغیرهای وابسته تحت شرایط بهینه انجام شد. مقادیر واقعی و پیش بینی شده برهم منطبق شدند. بنابراین تایید شد که مدل‌ها در تخمین منطقی و دقیق پیش بینی پاسخ‌ها قادر بودند.

کلید واژگان: آگار، سختی، پیوستگی، روش سطح پاسخ

*مسئول مکاتبات: Rezai_ma@modares.ac.ir

1. Response Surface Methodology
2. Central composite rotatable design

۱- مقدمه

سختی، حداکثر نیروی لازم در اولین فشار دستگاه و یا نیروی لازم برای رسیدن به یک تغییر شکل مشخص می‌باشد. پیوستگی نیز بیانگر مقدار تغییر شکلی است که در یک نمونه هنگام فشرده شدن قبل از پارگی روی دهد و وابسته به شدت پیوندهای داخلی سازنده بدنه محصول و همچنین برهم کنش‌های درون مولکولی می‌باشد [۹ و ۱۰].

اگر چه مطالعاتی بر استخراج آگار توسط محققان صورت گرفته است [۲، ۴، ۱۱، ۱۲، ۱۳] اما گزارش‌ها نشان می‌دهد تاکنون مطالعه‌ای بر خصوصیات آنالیز بافت آگار استخراجی از این آگاروفیت گزارش نشده است. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی خصوصیات بافتی آگار استحصالی از آگاروفیت *Gp. persica* به منظور کاربرد در صنایع مختلف و بهینه‌سازی آن بر اساس رویه سطح پاسخ^۶ جهت تقلیل در هزینه و زمان می‌باشد. ضمن این که بر اساس گزارش سازمان شیلات آگاروفیت *Gp. persica* یک گونه‌ی پرورشی بومی بوده که علاوه بر ضریب رشد بسیار بالا و هزینه پایین برای کشت و پرورش، اهمیت این آگاروفیت را دو چندان نموده است. بدیهی است با توجه به وجود این منبع پرورشی در کشور و پتانسیل تولید بیوپلیمر آگار، در این تحقیق از جلبک پرورشی *Gp. persica* به منظور استخراج آگار استفاده گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و تجهیزات آزمایشگاهی

مواد کلیدی: آگاروفیت *Gp. persica* از سایت‌های پرورشی استان هرمزگان واقع در بندر کلاهی، مواد شیمیایی شامل: هیدروکسید سدیم (شرکت شارلو اسپانیا)، اسید سولفوریک (شرکت مرک آلمان)، دی هیدروژن پتاسیم فسفات (شرکت شارلو اسپانیا)، و دی پتاسیم هیدروژن فسفات (شرکت شارلو اسپانیا).
تجهیزات: حمام روغن (Memmert، آلمان)، حمام آب (Memmert، آلمان)، آون (Memmert، آلمان)، بافت سنج (Brookfield.CT3، آمریکا)، pH متر (Jenway، انگلستان).

آگار پلی ساکارید زله‌ای قابل استحصال از دیواره سلولی برخی جلبک‌های قرمز می‌باشد. این کلونید آب دوست به دلیل وجود ترکیبات آگارز و آگاروپکتین خواص ژلاتینی و چسبندگی ایجاد می‌کند. به دلیل وجود خواص ژلی و غلیظ سازی عالی، از نظر صنعتی بسیار با اهمیت می‌باشد [۱] و کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی (۸۰٪)، صنعت و تکنولوژیکی (۲۰٪) پیدا کرده است [۲]. با توجه به ویژگی‌های کاربردی، این فیکوکلونید در طیف وسیعی از کارخانجات صنایع غذایی، داروسازی، آرایشی بهداشتی و همچنین تحقیقات بیولوژیکی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳ و ۴]. در واقع به منظور تثبیت کننده و افزایش ویسکوزیته در انواع روکش کرم‌ها، شیرینی‌جات، بستنی‌ها، ژله‌های تزئینی و... کاربرد دارد. علاوه بر آن به منظور تغلیظ نمودن و بهبود قابلیت برش در محصولات لبنی تخمیر شده (پنیر خامه‌ای، ماست)، فرآورده‌های کنسروی (گوشتی و ماهی) و همچنین به عنوان کلونیدی محافظ در محصولات گوشتی کاربرد دارد [۵ و ۶].

عموما کاربرد آگار در صنایع مختلف وابسته به شرایط کیفی آن می‌باشد. کیفیت آگار تولیدی همواره به پارامترهای فرآیند همچون شرایط پیش فرآوری و متغیرهای استخراج وابسته است. مطالعات نشان داده که در برخی موارد برای تولید آگار از بعضی آگاروفیت‌ها به منظور بهبود خواص ژلی، فرآیند پیش فرآوری قلبایی صورت می‌پذیرد، چرا که این فرآیند با انجام هیدرولیز قلبایی گروه‌های سولفات، علاوه بر استخراج بهتر پلی‌ساکارید از دیواره سلولی جلبک، منجر به بهبود کیفیت آگار استخراجی می‌شود [۷].

بر اساس پژوهش‌ها روش‌های متعددی جهت ارزیابی خواص آگار استحصالی وجود دارد. یکی از روش‌های مناسب برای این منظور، بررسی آنالیز پروفایل بافت^۳ (TPA) آن می‌باشد که با استفاده از فشرده سازی مکانیکی فرآورده حاصل می‌گردد [۸]. از جمله صفات مورد اندازه‌گیری بر اساس این آزمون می‌توان به سختی^۴ و پیوستگی^۵ اشاره کرد. بر اساس مطالعات، منظور از

3. Texture Profile Analysis

4. Hardness

5. Cohesiveness

6. Response Surface Methodology

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- آماده‌سازی جلبک پرورشی

(بدون پیش‌فرآوری) نیز ۱۰ گرم جلبک به مدت ۱۲ ساعت در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای محیط آبیگری شد. در ادامه استخراج در ۳۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۲ در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد برای ۹۰ دقیقه در حمام آبی صورت پذیرفت.

۲-۲-۲- تهیه نمونه ژل

برای تهیه نمونه ژل، ابتدا محلول آگار ۱/۵ درصد (w/v) در آب مقطر تهیه شد. برای این منظور ۴۵ میلی‌گرم پودر آگار در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر داغ ریخته و سپس بر روی هیتر همزن در دمای جوش (۱۰۰ درجه سانتیگراد) به منظور کاهش زمان انحلال قرار داده شد. به منظور جلوگیری از تبخیر، درب آن را بسته و پس از انحلال کامل، فوراً محلول به قوطی‌های پلاستیکی درب‌دار (۴۵ میلی‌متر ارتفاع و ۳۰ میلی‌متر قطر) ریخته شدند. سپس نمونه‌ها به منظور طی دوره رسیدگی ژل، ۲۴ ساعت در دمای محیط ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) قرار داده شدند و ژلهایی به عمق ۴۰ میلی‌متر شکل گرفتند [۲].

۲-۲-۳- طرح آزمایشی و روش آنالیز نتایج

در این پژوهش به منظور بهینه‌سازی فرآیند استخراج آگار از روش سطح پاسخ (RSM) تحت طرح مرکب چرخشی مرکزی (CCRD) استفاده شد. برای طرح مرکب مرکزی ۳ نوع آزمایش از جمله: آزمایشات فاکتوریل 2^k ، آزمایشات محوری 2^k و آزمایشات در نقاط مرکزی (C_p) مورد نیاز است که k بیان‌کننده تعداد متغیرهاست. بر اساس فرمول $N = 2^k + 2k + C_p$ مجموعه آزمایشات محاسبه شدند. مقدار α (فاصله نقاط محوری از مرکز) که به تعداد متغیرها بستگی دارد بر اساس فرمول $\alpha = [(2^k) \pm 1]^{1/2}$ تعیین گردید [۱۶].

بنابراین در این پژوهش، ۲۰ آزمایش در قالب طرح آزمایشات برای ۳ متغیر در ۵ سطح، توسط نرم افزار Design-Expert 7.01 (Stat-Ease, Inc, Minneapolis, MN, USA) طراحی شد. جدول ۱ محدوده آزمایش پارامترهای فرآیند را نشان می‌دهد. کد گذاری ماتریس طرح شده با مولفه‌های واقعی با ۸ نقطه فاکتوریل و ۶ نقطه محوری در جدول ۲ آورده شده است.

پس از جمع‌آوری آگاروفیت *Gp. persica* از سایت‌های پرورشی، به منظور حذف ناخالصی‌ها، با آب شیر شست و شو داده شدند. پس از غوطه‌وری در فرمالین ۱۰ درصد و شست و شوی مجدد، یک شبانه‌روز در مقابل آفتاب قرار گرفتند. سپس در آون ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت خشک گردیدند. پس از پودر نمودن، نمونه‌ها تا زمان پروسه استخراج در کیسه‌های پلی اتیلن در دمای یخچال ($4 \pm 1^\circ \text{C}$) نگهداری شدند [۱۴].

۲-۲-۲- آنالیزهای تقریبی

سنجش آنالیز تقریبی ترکیبات موجود در آگاروفیت پودر شده نیز بر اساس روش‌های استاندارد تعیین شد [۱۵]. اندازه‌گیری میزان چربی با استفاده از سوکسله و حلال هگزان انجام گردید. برای تعیین میزان پروتئین از روش میکروکلدال استفاده شد.

۲-۲-۳- استخراج هیدروکلئید آگار

پروسه استخراج به روش Freil-Pelegrin و Murano [۱۴] با اندکی تغییر در پارامترهای پیش‌فرآوری و استخراج صورت گرفت. برای هر تیمار ۱۰ گرم آگاروفیت پودر شده در نظر گرفته شد و فرآیند پیش‌تیمار قلبایی طی یک شب در پنج نقطه غلظتی (w/v) منطبق بر طرح آزمایش که در جدول ۱ آمده‌اند، در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول NaOH در دمای محیط انجام گرفت. سپس برای ۳ ساعت در حمام آبی با دمای ۹۰ درجه سانتیگراد قرار داده و به منظور حذف قلبای مازاد با آب مقطر در ۵۰۰ میلی‌لیتر برای ۲ بار شست و شو داده شد. برای تسریع در عمل خنثی‌سازی، نمونه‌ها در ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول H_2SO_4 ۰/۰۲۵ درصد برای ۲ ساعت قرار گرفتند. سپس با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر شست و شو داده شدند که این شست و شو نیز ۲ بار تکرار گردید. پس از شست و شوی نهایی، عملیات استخراج آگار از جلبک‌های پیش‌تیمار یافته، در ۳۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با PH برابر ۶/۲ در محدوده‌های دمایی و زمانی تعیین شده در طرح آزمایشات (جدول ۱) در حمام روغن انجام گرفت. پس از تخلیص، یک شب در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد منجمد گردید. سپس با دستگاه خشک‌کن در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد برای مدت زمان ۲۴ ساعت خشک شد. برای استخراج آگار بومی به روش سنتی

7. Factorial Runs
8. Axial Runs
9. Central point

جدول ۱ محدوده و سطح آزمایشی متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی ($\alpha = 1/1682$)

آزمایشات					محدوده	علامت	متغیرهای مستقل
$+\alpha$	+۱	۰	-۱	$-\alpha$			
۸	۶/۸	۵	۳/۲	۲	۲-۸	A	غلظت قلیا (%w/v)
۱۲۰	۱۱۴	۱۰۵	۹۶	۹۰	۹۰-۱۲۰	B	دما (°C)
۲	۲۰۰	۱۴۲	۸۵	۴۵	۴۵-۲۴۰	C	زمان (دقیقه)

جدول ۲ ماتریس طرح مرکب مرکزی و پاسخ‌های متغیرهای وابسته به متغیرهای مستقل

نقاط	مولفه های واقعی			مقادیر واقعی		مقادیر پیش بینی		
	A	B	C	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	
Center	۵	۱۰۵	۱۴۲	۱۶/۷۵	۰/۱۴۵	۱۶/۶۳	۰/۱۴۵	۱
Center	۵	۱۰۵	۱۴۲	۱۶/۰۱	۰/۱۴۲	۱۶/۶۳	۰/۱۴۵	۲
Center	۵	۱۰۵	۱۴۲	۱۶/۳۵	۰/۱۴	۱۶/۶۳	۰/۱۴۵	۳
Center	۵	۱۰۵	۱۴۲	۱۷/۲۹	۰/۱۵	۱۶/۶۳	۰/۱۴۵	۴
Center	۵	۱۰۵	۱۴۲	۱۷/۲۲	۰/۱۳۹	۱۶/۶۳	۰/۱۴۵	۵
Center	۵	۱۰۵	۱۴۲	۱۶/۹۸	۰/۱۴	۱۶/۶۳	۰/۱۴۵	۶
Fact	۳/۲	۹۶	۸۵	۱۱/۴۳	۰/۱۶۸	۱۱/۷۰	۰/۱۶۹	۷
Fact	۶/۸	۹۶	۸۵	۱۳/۴۹	۰/۱۴۶	۱۳/۴۴	۰/۱۴۵	۸
Fact	۲/۳	۱۱۴	۸۵	۱۵/۵۹	۰/۱۳۶	۱۵/۸۴	۰/۱۳۴	۹
Fact	۶/۸	۱۱۴	۸۵	۱۶/۰۴	۰/۱۵۳	۱۶/۱۳	۰/۱۵۸	۱۰
Fact	۲/۳	۹۶	۲۰۰	۱۳/۶۸	۰/۱۷۲	۱۳/۶۸	۰/۱۶۸	۱۱
Fact	۶/۸	۹۶	۲۰۰	۱۵/۵۵	۰/۱۴۶	۱۵/۴۲	۰/۱۴۴	۱۲
Fact	۳/۲	۱۱۴	۲۰۰	۱۵/۸۱	۰/۱۵۲	۱۵/۹۵	۰/۱۵۴	۱۳
Fact	۶/۸	۱۱۴	۲۰۰	۱۶/۴	۰/۱۸۳	۱۶/۲۴	۰/۱۷۸	۱۴
Axial	۲	۱۰۵	۱۴۲	۱۵/۷۲	۰/۱۶۳	۱۵/۷۸	۰/۱۵۴	۱۵
Axial	۸	۱۰۵	۱۴۲	۱۶/۸۸	۰/۱۴۶	۱۷/۴۹	۰/۱۵۴	۱۶
Axial	۵	۹۰	۱۴۲	۱۱/۰۸	۰/۱۴۳	۱۱/۰۷	۰/۱۴۵	۱۷
Axial	۵	۱۲۰	۱۴۲	۱۵/۳۸	۰/۱۶۱	۱۵/۲۴	۰/۱۴۵	۱۸
Axial	۵	۱۰۵	۴۵	۱۴/۳۳	۰/۱۶۳	۱۴/۰۴	۰/۱۶	۱۹
Axial	۵	۱۰۵	۲۴۰	۱۵/۶۴	۰/۱۷۳	۱۵/۷۸	۰/۱۷۶	۲۰

A: غلظت قلیا (w/v)؛ B: دمای استخراج (□C)؛ C: زمان استخراج (دقیقه)

Y_1 : سختی ژل استخراج (N)، Y_2 : پیوستگی ژل

داده‌های به دست آمده از طریق مدل رگرسیون چند جمله‌ای ذیل قابل بیان است:

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

Y نشان دهنده مقدار پاسخ پیش بینی شده (متغیرهای وابسته)، K نمایانگر تعداد متغیرها، x_i ، x_2 ، ...، x_k متغیرهای مستقل،

چون نقاط مرکزی ۶ مرتبه در شرایط مشابه تکرار می‌شوند، تخمین مستقل خطای آزمایش‌ها ممکن است و تکرار تمامی نقاط آزمایش‌ها غیر ضروری می‌باشد. از خطای خالص نیز به منظور بررسی نکویی برازش (میزان انطباق)^{۱۰} استفاده گردید [۱۷].

¹⁰ Goodness of fit

نیوتن) تنظیم شد. مقادیر بر اساس بیشترین نیروی وارده در دو تناوب رفت و برگشتی با استفاده از پروب استوانه‌ای پلاستیکی با قطر ۱۲/۷ میلی‌متر، سرعت نفوذ ۱ میلی‌متر بر ثانیه و تا ۵۰٪ ارتفاع اولیه فشرده‌گی، ثبت شد [۲ و ۱۳]. صفات مورد اندازه‌گیری بر اساس این آزمون سختی و پیوستگی ژل آگار استحصالی بودند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیز تقریبی ترکیبات آگاروفیت

پیش از مرحله استخراج بیوپلیمر آگار، آنالیز تقریبی جلبک پرورشی *Gp. persica* از نظر مقدار رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین با سه تکرار بر اساس روش استاندارد مورد آنالیز قرار گرفتند [۱۵] که به ترتیب برابر با 0.35 ± 0.08 ، 13.76 ± 0.04 ، 0.76 ± 0.09 و 19 ± 0.19 برآورد شدند. تفاوت در مقدار ترکیبات گونه‌های مختلف آگاروفیت، منجر به نشان دادن رفتار متفاوت آگاروفیت در شرایط مختلف استخراج می‌گردد. در نتیجه ممکن است خصوصیات بافتی آگار استخراجی را نیز تحت تاثیر قرار دهد [۳].

۳-۲- سختی ژل

نتایج جدول آنالیز آماری شماره ۳ حاکی از آن است که اثر تمامی متغیرهای ورودی (A، B و C) بر سختی ژل معنادار بوده‌اند ($p < 0.05$). اثرات همزمان متغیرهای AB و AC نیز همانند متغیرهای درجه دوم B2 و C2 نیز معنادارند. با توجه به عدم معناداری متغیرهای همزمان AB و درجه دوم A2 و تاثیرگذاری بر میزان ضریب تبیین تطابق یافته و پیش‌بینی شده، از مدل حذف شدند. در نهایت ضرایب تبیین R^2 ، تطابق یافته و پیش‌بینی شده نیز به ترتیب ۰/۹۶۴۶، ۰/۹۴۳۹ و ۰/۹۲۷۴ به دست آمدند که نشان از رضایت بخشی مدل می‌باشد. مقادیر ۲۴/۳۸۴، ۴/۲۵ و ۲/۷۰٪ به ترتیب برای *Adequate precision* و *PRESS* و *C.V* و همچنین نیز برای انحراف معیار و میانگین به ترتیب

اثرات $x_1^2, \dots, x_j^2, \dots, x_k^2$ اثرات مجذور متغیرها $x_1x_2, x_1x_3, \dots, x_{i-1}x_i, \dots$ کنش متقابل بین متغیرها، β_0 مقدار عرض از مبدا، $\beta_i (i = 1, 2, \dots, k)$ اثرات خطی بین متغیرها، $\beta_{ij} (i = 1, 2, \dots, k; j = 1, 2, \dots, k)$ اثرات مجذور بین متغیرها، $\beta_{ij} (i = 1, 2, \dots, k; j = 1, 2, \dots, k)$ اثرات متقابل بین متغیرها و ε خطای احتمالی است [۱۸].

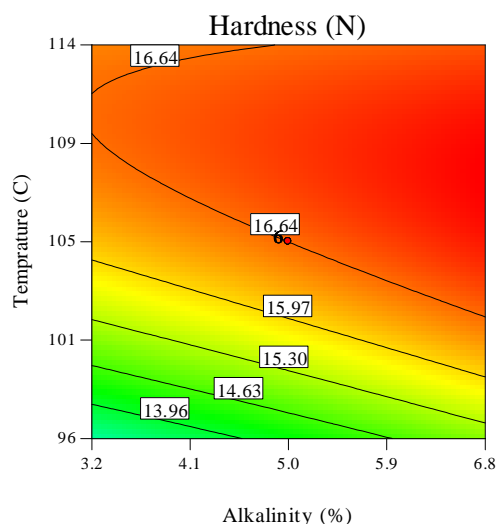
به منظور آزمون آماری مدل به دست آمده برای هر پاسخ، آزمون آنالیز واریانس^{۱۱} صورت گرفت. به منظور برازش^{۱۲} مدل، ضمن بررسی مدل پیشنهادی، مقادیر عدم برازش^{۱۳} و ضرایب R^2 آن مورد توجه قرار گرفت. همواره باید مقدار *p-value* برای مدل کمتر از ۰/۰۵ و برای عدم برازش بیشتر از این مقدار باشد. در ادامه برای سنجش و اعتبار مدل به بررسی مقادیر ضریب تبیین R^2 ، ضریب تبیین تطابق یافته^{۱۴} و ضریب تبیین پیش‌بینی شده^{۱۵} پرداخته شد. بهتر است مقدار عددی ضریب تبیین R^2 برای داده‌هایی با ماهیت شیمیایی بیشتر از ۰/۸ باشد [۱۳]، هر چند که بر اساس راهنمای نرم افزار مقادیر بالای ۰/۶ هم ممکن است مورد قبول باشد. علاوه بر این، به مقادیر *PRESS*^{۱۶} و همچنین دقت مناسب^{۱۷} مدل نیز توجه گردید. مقدار *PRESS* معیاری از میزان تناسب یک مدل در هر یک از نقاط می‌باشد، که هر چه کمتر باشد بهتر است. مقدار *Adequate precision* حاکی از دقت مناسب مدل می‌باشد که هر چه بیشتر از مقدار ۴ باشد، مطلوب‌تر به نظر می‌رسد. در پایان نیز پس از استحصال نقطه بهینه در آزمایشگاه، به منظور بررسی تفاوت بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی مدل از روش *t* یک نمونه^{۱۸} نرم‌افزار *SPSS* نسخه ۱۶ استفاده گردید.

۲-۲-۶- ارزیابی بافت

در این پژوهش جهت آنالیز پروفایل بافت، از دستگاه آنالیز کننده بافت استفاده شد. پس از طی دوره‌ی رسیدگی ژل جهت تعیین ویژگی‌های بافتی، میزان بارگذاری دستگاه روی ۱ کیلوگرم (۱)

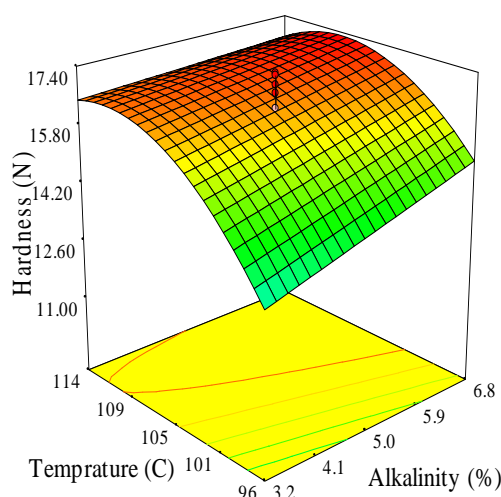
11. ANOVA
12. Fitness
13. Lack of fit
14. Adjusted *R*-squared
15. predicted *R*-squared
16. Predicted Residual Sum of Squares
17. Adequate precision
18. One Sample T test

[۱۹] و Orduña-Rojas و همکاران [۲۰]، بهبود خواص ژله‌ای نمونه پیش فرآوری در مقایسه با نمونه بومی را گزارش کرده‌اند. شکل‌های ۱ و ۲ برهمکنش زمان استخراج و غلظت قلیا (AC) و همچنین دما و زمان استخراج (BC) بر سختی ژل را نشان می‌دهند. به گونه‌ای که همزمان با افزایش دمای استخراج و غلظت قلیا، میزان سختی ژل افزایش می‌یابد و آگار با سختی ژل بالا، از آگاروفیت پیش تیمار یافته در دماها و غلظت‌های بالای قلیا، استخراج شده‌اند که نشان از عملکرد قلیای موجود جهت حذف گروه‌های سولفات و افزایش سختی ژلی در این محدوده می‌باشد [۲۱] و ۵].



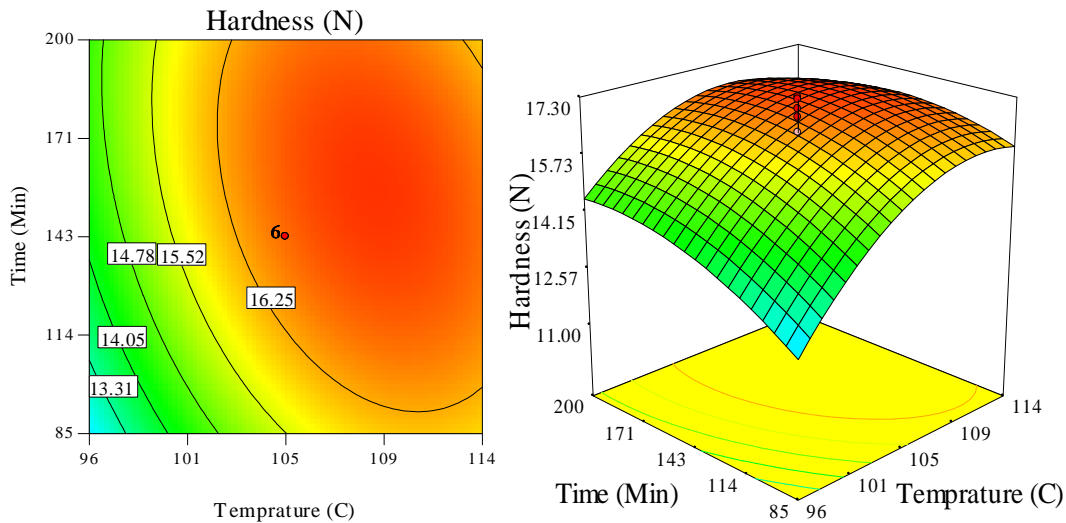
شکل ۱ نمودارهای کانتور و سه بعدی اثرات همزمان غلظت قلیا و دمای استخراج بر سختی ژل آگار

۰/۴۲ و ۱۵/۳۸ محاسبه شدند. پس از تایید مدل از نظر میزان دقت (جدول ۴)، تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه انجام گرفت و مدل رگرسیون ریاضی آن محاسبه گردید (جدول ۵). در پژوهش حاضر میزان سختی ژل آگار استحصالی از نمونه بومی (روش سنتی: بدون پیش‌فرآوری) بسیار ضعیف ($N \pm 0.06$) (۰/۹۳) ارزیابی شد ولی با انجام عملیات پیش‌فرآوری این ویژگی بسیار تقویت گردید و سختی ژل در محدوده $N \pm 11.08 - 17.29$ به دست آمد. بنابراین آگار تولید شده با نمونه‌های تیمار یافته، سختی ژلی بهتری را نسبت به نمونه‌ی بدون پیش‌فرآوری از خود نشان داده است که حاکی از اثرات مثبت غلظت قلیا بر خصوصیت ژلی می‌باشد. محققانی چون Higuera و همکاران



و پیرووات جایگزین آن شده‌اند [۲۲]. لذا ممکن است در ابتدای همزمانی این دو متغیر، مقدار بیشتری از گروه‌های سولفات به واحدهای تقویت کننده ژل تبدیل شده باشد، اما پس از این محدوده، این روند متوقف و در نتیجه تغییرات قابل مشاهده‌ای در میزان سختی ژل محسوس نباشد.

شکل ۲ نشان می‌دهد که همزمان با افزایش دما و زمان استخراج، سختی ژل هم فزونی می‌یابد، اما این روند یکسان نمی‌باشد چرا که همزمان با افزایش دما از $110^{\circ}C$ و افزایش زمان از ۱۷۰ دقیقه این روند افزایشی متوقف می‌گردد. همواره ژل‌های مستحکم‌تر حاوی مقادیر بالاتری از واحدهای ژله‌ای گارز هستند، در حالی که ژل‌های ضعیف حاوی مولکول‌های آگارزی هستند که سولفات



شکل ۲ نمودارهای کانتور و سه بعدی اثرات همزمان دما و زمان استخراج بر سختی ژل آگار

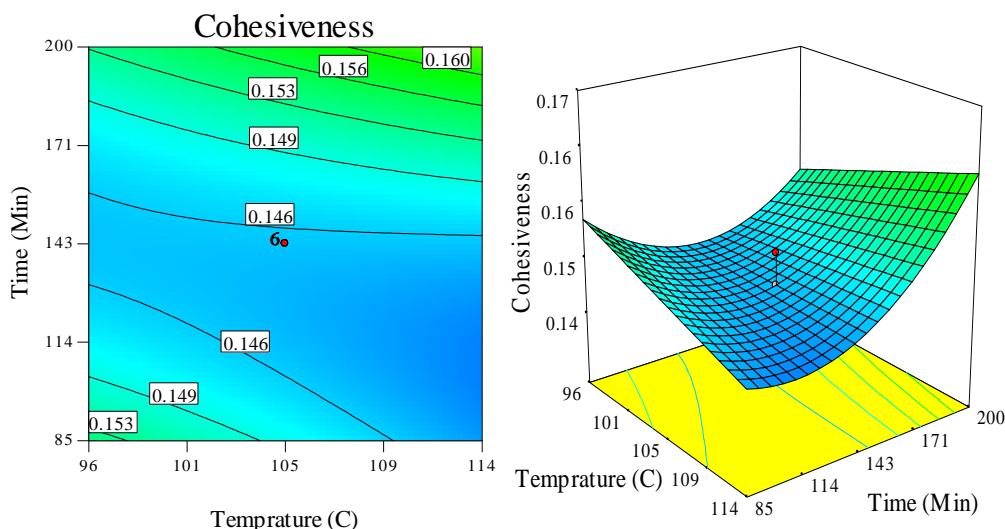
بر اساس تجزیه و تحلیل رگرسیونی معادله ریاضی پیوستگی نیز به دست آمد (جدول ۵).

مقدار پیوستگی برای ژل آگار بومی (بدون پیش فرآوری) ۰/۱۳۶ محاسبه گردید. ولی با انجام تیمارهای قلیایی و دما مقدار پیوستگی ژل افزایش یافته و در محدوده ۰/۱۸۳-۰/۱۳۶ متغیر بود. بنابراین آگار تولید شده با نمونه‌های تیمار یافته، پیوستگی بهتری را نسبت به نمونه بدون پیش‌فرآوری از خود نشان داده است که نشان از تاثیر شرایط آزمایشات می‌باشد.

اثر همزمان دما و زمان استخراج بر پیوستگی ژل نیز در شکل ۳ نشان داده شده است. در ابتدایی این همزمانی میزان پیوستگی ژل کاهش می‌یابد ولی در زمان‌های بالای استخراج با افزایش دما پیوستگی ژل افزایش می‌یابد که شاید در دماهای بالاتر احتمال تشکیل تعاملات پایدارتر درون توالی ژلی بیشتر رخ داده است، لذا مقدار پیوستگی افزایش یافته است [۱۲]. بیشترین مقدار پیوستگی در بالاترین محدوده دمایی وزمانی استخراج (۱۲۰°C و ۲۴۰ دقیقه) می‌باشد.

۲-۳- پیوستگی ژل

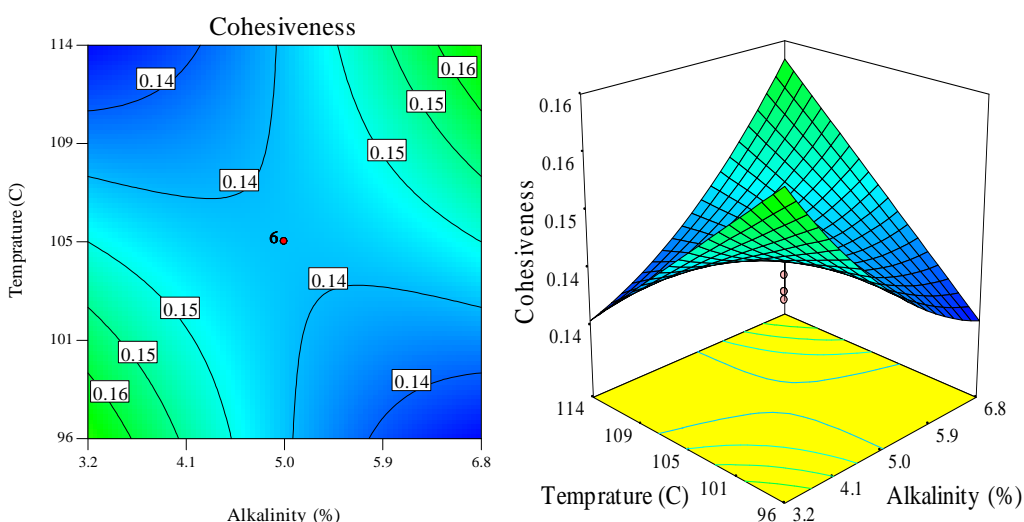
فاکتورهای ممکن جهت حضور در فرآیند مدل‌سازی بر اساس میزان p -value حاصل از آنالیز واریانس نشان می‌دهد (جدول ۳) که از بین متغیرهای ورودی فقط زمان استخراج به تنهایی تاثیری معناداری بر روی پیوستگی ژل آگار داشته است ($p < 0.05$). در میان مولفه‌های همزمان، فقط اثر همزمان قلیا و زمان (AC) اثر معنادار بر پیوستگی ژل نداشت. اگر چه در میان مولفه‌های درجه دوم فقط مولفه $C2$ معنادار بود ولی با توجه به تاثیرگذاری بر میزان ضرایب $R2$ ، مولفه درجه دوم $A2$ علی‌رغم عدم معناداری ($p > 0.05$) نیز در مدل مورد استفاده قرار گرفت. با این وجود ضریب تبیین R^2 برابر با ۰/۸۱۶۹، ضریب تبیین تطابق یافته و پیش بینی شده نیز به ترتیب ۰/۷۵۱۵ و ۰/۶۴۵۶ محاسبه شدند. برای میانگین و انحراف معیار مدل به ترتیب مقادیر ۰/۱۵ و 6.06×10^{-3} و همچنین مقادیر $PRESS$ ، $Adequate$ precision و CV ، به ترتیب 1.21×10^{-3} و ۱۲/۰۶۵ و ۴/۳۷٪ برآورد شدند. پس از احراز شایستگی مدل پیشنهادی (جدول ۴)،



شکل ۳ نمودارهای کانتور و سه بعدی اثرات همزمان دما و زمان استخراج بر پیوستگی ژل آگار

حضور قلیا رخ دهد [۱۹] چرا که این پیش سازها برای جلوگیری از زوج شدن رشته های مارپیچ حلزونی پلیمر عمل می کنند [۷] لذا با هیدرولیز آن ها ممکن است پیوستگی رشته های پلیمری افزایش یابد. از طرف دیگر آسیب و یا تغییر در ساختار مولکولی آگار به واسطه فزونی حرارت ممکن است منجر به گسستگی درونی رشته ها و یا رفتار متفاوت پیوستگی ژل آگار گردد.

اثر همزمان قلیا و دمای استخراج بر پیوستگی ژل نیز در شکل ۴ نشان می دهد که در ابتدا و انتهای این همزمانی مقدار پیوستگی ژل افزایش یافته و بیشترین مقادیر، مربوط به قلیاها و دماهای بالاتر استخراج می باشد. در صورتی که در دماهای بالا و قلیا کم و همچنین قلیا های زیاد در دمای پایین، کمترین مقدار پیوستگی حاصل می شود. بر اساس مطالعات با افزایش غلظت قلیا و دمای استخراج، ممکن است هیدرولیز فراوان پیش سازهای آگارز با



شکل ۴ نمودارهای کانتور و سه بعدی اثرات همزمان غلظت قلیا و دما استخراج بر پیوستگی ژل آگار

واقعیت دخیل هستند. اولین فاکتور میزان گروه سولفات پلی- ساکارید می باشد که آن نیز بسته به موقعیت و جایگاه خود منجر

عمدتا خواص ژلی آگار به ساختار شیمیایی پلی ساکاریدی آن وابسته است. بر اساس مطالعات انجام شده دو فاکتور مهم در این

به تقویت و یا تضعیف ژل می‌گردد. فاکتور دیگر میزان جانشینی منظم گروه‌های ۳،۶ انیدرو L گالاکتوز و D گالاکتوز می‌باشد که برای ساختار زنجیره‌ای نیز ضروری هستند [۲۳]. در واقع حضور بیش از حد واحدهای پیش‌ساز (سولفات) در مولکول آگار، مانع

از اجتماع مولکولی مورد نیاز برای تشکیل ژل می‌گردد، که پیش-فرآوری قلیا نقش مهمی را در حذف آن و استحکام ژل ایفا می-کند [۱۱].

جدول ۳ آنالیز آماری فاکتورهای دخیل در مدل سختی و پیوستگی ژل آگار استحصالی

پاسخ	فاکتور	ضریب برآورد	درجه آزادی	F- value	p-value	خطای استاندارد
سختی	A	۰/۵۱	۱	۲۰/۲۷	۰/۰۰۰۷	۰/۱۱
	B	۱/۲۴	۱	۱۲۱/۰۸	۰/۰۰۰۱>	۰/۱۱
	C	۰/۵۲	۱	۲۱/۶۶	۰/۰۰۰۶	۰/۱۱
	AB	-۰/۳۶	۱	۶/۰۳	۰/۰۳۰۳	۰/۱۵
	BC	-۰/۴۷	۱	۱۰/۱۲	۰/۰۰۷۹	۰/۱۵
	B ²	-۱/۲۳	۱	۱۲۷/۲۸	۰/۰۰۰۱>	۰/۱۱
	C ²	-۰/۶۰	۱	۳۱/۱۸	۰/۰۰۰۱>	۰/۱۱
پیوستگی	C	۴/۸۳۴E-۰۰۳	۱	۷/۱۷	۰/۰۱۸۰	۱/۸۰۶E-۰۰۳
	AB	۰/۰۱۲	۱	۲۵/۷۹	۰/۰۰۰۲	۲/۳۶۳E-۰۰۳
	BC	۵/۲۵۰E-۰۰۳	۱	۴/۹۴	۰/۰۴۳۳	۲/۳۶۳E-۰۰۳
	A ²	۳/۴۷۰E-۰۰۳	۱	۳/۹۲	۰/۰۶۷۷	۱/۷۵۲E-۰۰۳
	C ²	۸/۱۵۲E-۰۰۳	۱	۲۱/۹۵	۰/۰۰۰۴	۱/۷۴۰E-۰۰۳

A: غلظت قلیا (%), B: دمای استخراج (□C), C: زمان استخراج (دقیقه)

جدول ۴ نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس سختی و پیوستگی ژل آگار استحصالی

منبع تغییرات	جمع مربعات	مربع میانگین	درجه آزادی	F-value	p-value
مدل رگرسیون	۵۶/۵۳	۸/۰۸	۷	۴۶/۷۱	۰/۰۰۰۱>
باقیمانده	۲/۰۷	۰/۱۷	۱۲		
سختی	۰/۸۰	۰/۱۱	۷	۰/۴۵	۰/۸۳۷۰
	۱/۲۷	۰/۲۵	۵		
	۵۸/۶۱		۱۹		
Cor total					
مدل رگرسیون	۲/۷۹۰E-۰۰۳	۵/۵۷۹E-۰۰۴	۵	۱۲/۴۹	۰/۰۰۰۱>
باقیمانده	۶/۲۵۴E-۰۰۴	۴/۴۶۷E-۰۰۵	۱۴		
عدم برازش	۵/۳۸۰E-۰۰۴	۵/۹۷۸E-۰۰۵	۹	۳/۴۲	۰/۰۹۴۴
خطای خالص	۸/۷۳۳E-۰۰۵	۱/۷۴۷E-۰۰۵	۵		
Cor total	۳/۴۱۵E-۰۰۳		۱۹		

جدول ۵ معادلات رگرسیونی متغیرهای وابسته

پاسخ	معادله
سختی ژل	$1.6764 + 0.51A + 1.24B + 0.52C - 0.36AB - 0.47BC - 1.23B^2 - 0.60C^2$
پیوستگی ژل	$0.15 + 834E-003C + 0.12 + AB + 5/250 + E-003BC + 3/470 E-003A^2 + 8/152E-003C^2$

۳-۳- بهینه‌سازی و انتخاب تیمار بهینه

برای بهینه‌سازی کلی پاسخ‌ها، در ابتدا برای هر متغیر و هر پاسخ، بیشینه و یا کمینه آن با یک ضریب اهمیتی که وابسته به مسائل اقتصادی، زیست‌محیطی و طرز تفکر محقق می‌باشد [۱۷]، صورت گرفت. در این پژوهش متغیر غلظت قلیا به دلیل تاثیر در بهبود خواص کیفی آگار و مسائل زیست محیطی با اهمیت ۵ کمینه می‌شود. دما و زمان استخراج به دلیل مسائل اقتصادی و اهمیت آن در پروسه استخراج در همان محدوده آزمایش تعریف شدند. سختی و پیوستگی محصول به دلیل اهمیت آن در صنعت با ضریب اهمیت ۵ بیشینه گردید. در این روش تمامی فضای قابل پیش‌بینی جستجو شده و مناطقی که دارای شرایط دلخواه تعیین شده باشند، انتخاب گردیدند. در پایان شرایط بهینه برای غلظت قلیا ۳/۲٪، دمای استخراج ۱۱۰ °C و زمان استخراج ۲۰۰ دقیقه به دست آمد. مقادیر واقعی و پیش‌بینی مدل و نتایج حاصل از مقایسه میانگین آن‌ها در جدول ۶ نشان داده شده است. با توجه به این که مقدار معناداری مشاهده شده از سطح ۰/۰۵ بزرگ‌تر است، لذا تفاوت معنی‌داری بین مقادیر واقعی با مقادیر حاصل از پیش‌بینی مدل در مورد هیچ یک از پارمترها وجود ندارد و حاکی از مطابقت مدل با مقادیر واقعی می‌باشد.

۴- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از رویه سطح پاسخ مربوط به طرح مرکب مرکزی چرخشی با سه متغیر مستقل غلظت قلیا، دما و زمان استخراج، متغیرهای سختی و پیوستگی ژل بهینه سازی گردیدند. مطابق با نتایج می‌توان ابراز نمود که رویه سطح پاسخ روش مناسبی در بهینه سازی این پاسخ‌ها می‌باشد. آنالیزهای آماری نشان داد تمامی متغیرهای ورودی تاثیر معناداری بر سختی ژل داشته‌اند ($p < 0/05$) که در این میان دمای استخراج نقش بیشتری را داشته است. برای پیوستگی ژل نیز فقط زمان استخراج به عنوان یک متغیر ورودی معنادار مشخص گردید. بر اساس نتایج، روش استخراج مذکور نسبت به روش سنتی (بدون پیش‌فرآوری) تاثیر بسزایی بر ویژگی‌های مورد مطالعه داشته است که منجر به افزایش این ویژگی‌ها گردید. در پایان مدل چندجمله‌ای با مقادیر R2 بالا نیز به دست آمد که حاکی از تناسب مدل می‌باشد. شرایط بهینه نیز برای بیشترین مقدار سختی ژل برای متغیرهای غلظت قلیا ۳/۲٪، دمای استخراج ۱۱۰ °C و زمان استخراج ۲۰۰ دقیقه به دست آمد. مقادیر حاصل در تطابق با مقادیر پیشنهادی مدل رضایت بخش بودند و تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند ($p < 0/05$).

جدول ۶ مقایسه نتایج پیش‌بینی مدل و آزمایشات تجربی

پاسخ	پیش‌بینی مدل	مقادیر واقعی	p-value
سختی (N)	۱۶/۲۸	۱۶/۱۸±۰/۵	۰/۴۲۵
پیوستگی	۰/۱۵۷	۰/۱۵±۰/۰۳	۰/۱۰۱

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

۵- قدردانی

به رسم ادب از مجموعه دوستان عزیز در بندر کلاهی جهت همکاری در تهیه نمونه جلبک پرورشی و کارشناسان گرامی در آزمایشگاه فرآوری آبزیان دانشکده و مرکز رشد و فناوری طبرستان ساری و همچنین مهندس یوسفی و مهندس دانشی بسیار سپاسگزاری می‌گردد.

۶- منابع

- [1] Pereira-Pacheco, F., Robledo, D., Rodríguez-Carvajal, L. & Freile-Pelegrín, Y. (2007). Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from Yucatán, México. *Bioresource Technology*, 98: 1278–1284.
- [2] Kumar, V. and Fotedar, R. (2009). Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, & Kraft, 1994). *Carbohydrate Polymers*, 78: 813–819.
- [3] Marinho-Soriano, E. and Bourret, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae),

- (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Bioresource Technology*, 96: 295–302.
- [15] AOAC. (1990). Official methods of analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- [16] Box, G.E.P. and Hunter, J.S. (1957). Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. *Ann. Math. Statist*, 28: 195–241.
- [17] Khuri, A.I. and Mukhopadhyay, S. (2010). "Response Surface Methodology." In E.J. Wegman, Y.H. Said, and D.W. Scott, (Eds). Wiley Interdisciplinary Reviews - Computational Statistics, Vol. 2(2) (pp. 128–149). Wiley, Hoboken, New Jersey,
- [18] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, S.L., & Escalera, L.A. (2008). Review: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76: 965–977.
- [19] Arvizu-Higuera, D.L., Rodríguez-Montesinos, Y.E., Murillo-Álvarez, J.I., Muñoz-Ochoa, M., & Hernández-Carmona, G. (2008). Effect of alkali treatment time and extraction time on agar from *Gracilaria vermiculophylla*. *Journal of Applied Phycology*, 20: 515–519.
- [20] Orduña-Rojas, J., García-Camacho, K.Y., Orozco-Meyer, P., Ríosmena-Rodríguez, R., Pacheco-Ruiz, I., Zertuche-González, J.A. & Meling-López, A.E. (2008). Agar properties of two species of Gracilariaceae from the Gulf of California, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, 20: 169–175.
- [21] Ahmad, R., Surif, M., Ramli, N., Yahya, N., Rahiman, M.A.N., & Babayeva, L. (2011). A preliminary study on the agar content and agar gel strength of *Gracilaria manilensis* using different agar extraction processes. *World Applied Sciences Journal*, 15 (2): 184–188.
- [22] Rebello, J., Ohno, M., Ukeda, H. & Sawamura, M. (1997). Agar quality of commercial agarophytes from different geographical origins: 1. Physical and rheological properties. *Journal of Applied Phycology*, 8: 517–521.
- [23] Marinho-Soriano, E., Bourret, E., Moreira, D., Casabianca, M.L. & Maury, L. (1999). Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastor*. *Bioresource Technology*, 67: 1–5.
- Rhodophyta). *Bioresource Technology*, 90: 329–33.
- [4] Villanueva, R.D., Sousa, A.M.M., Gonçalves, M.P., Nilsson, M. & Hilliou, L. (2010). Production and properties of agar from the invasive marine alga, *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 22: 211–220.
- [5] Armisen, R. (1995). World-wide use and importance of Gracilaria. *Journal of Applied Phycology*, 7: 231–243.
- [6] Venugopal, V. (2009). Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- [7] Armisen, R., Galatas, F., Hispanagar, S.A., and Spain. (2009). Agar. In: Phillips, G.O. and Williams, P.A. (2th edn). A Handbook of hydrocolloids. (pp. 82-107). Cambridge, UK.
- [8] Lau, M., H., Tang, J. & Paulson, A., T. (2000). Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. *Food Research International*, 33: 665-671.
- [9] Fox, P., Guinee, T., Cogan, M., and McSweeney, P. (2000). Fundamentals of cheese science. Aspen publication.
- [10] Gunasekaran, S., and Mehmet, A. (2003). Cheese rheology and texture. CRC Press LLC
- [11] Falshaw, R., Furneaux, R.H., & Stevenson, D.E. (1998). Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdia* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, 308: 107-115.
- [12] Rodríguez, M.C., Matulewicz, M.C., Nosedá, M.D., Ducatti, D.R.B. & 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.
- [13] Sousa, A.M., Alves, V.D., Morais, S., Delerue-Matos, C. & 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. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.061. Epub 2010 Jan 6.
- [14] Freile-Pelegrián, Y. & Murano, E. (2005). Agars from three species of Gracilaria

Study the effect of extraction conditions on textural properties of agar extracted from cultural alga (*Gracilariopsis persica*) using RSM

Entesarian, M. R. ¹, Rezaei, M. ^{2*}, Motamedzadegan, A. ³, Daryaei, A. R. ⁴

1. M.s.c Student of Seafood Science of Seafood Science and Technology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor
2. Professor of the Department of Seafood Science and Technology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor
3. Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari
4. Didactic Instructors, Academic Member of the Department of Aquaculture, Islamic Azad University Bandar Abbas

(Received: 92/10/23 Accepted: 93/4/8)

In this study, agar hardness and cohesiveness of cultured alga *Gracilariopsis persica* was optimized by using response surface methodology (RSM) under a central composite rotatable design (CCRD). Gel samples were extracted with three independent variables in five levels: alkalinity concentration (2-8%), extraction time (45-240 minutes) and extraction temperature (90-120°C). The results showed that all of the independent variables significantly ($P < 0.05$) affected on hardness, whereas variable of extraction time had significant effect on cohesiveness. Quadratic models developed for the responses indicated that optimum conditions based on the highest gel hardness and cohesiveness to be alkalinity concentration, extraction temperature and extraction time 3.2%, 110 °C and 200 minutes, respectively. The predicted responses for these extraction conditions included hardness of 16.28 N and cohesiveness 0.157. Verification experiments were conducted under optimal conditions to compare predicted and actual values of the dependent variables. Both actual and predicted values were found to nearly coincide, confirming that the estimation models were capable of reasonably and accurately predicting the responses.

Keywords: Agar, Hardness, Cohesiveness, Response Surface Methodology

* Corresponding Author E-Mail Address: Rezaei_ma@modares.ac.ir