

## بهینه سازی استخراج پکتین از غلاف نخود فرنگی به کمک امواج میکروویو با استفاده از روش سطح پاسخ

منا بهرامی پور<sup>۱</sup>، بهروز اکبری آدرگانی<sup>۲\*</sup>

۱- کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، آزمایشگاههای مرجع کنترل غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۳)

### چکیده

در این پژوهش از روش سطح پاسخ و طرح باکس-بنکن برای بهینه‌سازی شرایط استخراج به کمک امواج مایکروویو پکتین حاصل از غلاف نخود فرنگی (بعنوان یک منبع جدید) استفاده شد. تاثیر متغیرهایی همچون توان میکروویو، مدت زمان مواجهه با امواج و pH بر برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و کاربردی پکتین استخراجی، همچون محتوای گالاکتورونیک اسید، درجه استریفیکاسیون، خواص امولسیفایری، پایداری امولسیون و رفتار طیف مادون قرمز تبدیل فوریه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بازده استخراج پکتین حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو در دامنه ۲ تا ۱۵/۶ درصد بود. همچنین، بازده پکتین استخراجی در شرایط بهینه استخراج (توان میکروویو ۶۰۰ وات، زمان استخراج ۴ دقیقه و pH برابر با ۱/۰) برابر با ۱۷/۱ درصد پیش بینی شد. آزمون تأییدیه، که شامل بررسی میزان راندمان استخراج در شرایط بهینه پیش بینی شده با سه تکرار بود، نشان داد که راندمان استخراج در این شرایط برابر  $۱۶/۹۵ \pm ۰/۴۳$  بود. درجه استریفیکاسیون پکتین حاصل در دامنه ۱۸/۳۶ و ۳۲/۹۴ درصد و همچنین این فاکتور در پکتین استخراج شده در شرایط بهینه استخراج برابر با ۲۳ درصد بود. علاوه بر این، درصد گالاکتورونیک اسید پکتین استخراجی در شرایط بهینه استخراج برابر با  $۶۹/۲۳ \pm ۱/۴۳$  درصد بود. فعالیت امولسیفایری پکتین استخراجی در شرایط مذکور برابر با ۳۸ درصد بوده و همچنین پایداری امولسیون‌های پایدار شده با پکتین استخراجی، در هر دو دمای ۴ و ۲۳ درجه سلسیوس مناسب بود.

کلید واژگان: پکتین، غلاف نخود فرنگی، بهینه‌سازی، روش سطح پاسخ

\* مسئول مکاتبات: analystchemist@yahoo.com

## ۱- مقدمه

منظور بر طرف کردن نیاز صنعت استخراج شده است که از جمله این منابع می توان به تفاله لوبیا [۱۰]، پوست هندوانه [۱۱]، پوست سویا [۱۲]، پوست موز [۱۳] و پوست نارنج [۶] اشاره کرد. نخود فرنگی یا نخود سبز<sup>۱</sup> با نام علمی *Pisum sativum* L. گیاهی یکساله بوده که به فراوانی در اروپای مرکزی، آسیا و شمال غرب هندوستان کشت می شود. نخود فرنگی سبزی با ارزشی است که به صورت خام یا پخته مورد استفاده قرار می گیرد. این سبزی دارای مقدار زیادی پروتئین و کربوهیدرات می باشد، بطوری که در ۱۰۰ گرم نخود فرنگی نارس بین ۳ تا ۶ گرم پروتئین وجود دارد. غلاف نخود فرنگی که قسمت بزرگی از وزن آن را تشکیل می دهد، به طور عمده به عنوان ضایعات دور ریخته شده و یا به مصرف دام می رسد، در حالی که می توان با استخراج پکتین از این ضایعات، نیاز کشور را تاحد زیادی به واردات پکتین مرتفع ساخت (Dixit et al., 2001). در فرایند استخراج سنتی، پکتین معمولاً با استفاده از محلول های اسیدی شده با اسید های معدنی استخراج می شود (Xu et al., 2014). این محلول ها نه تنها سبب خوردگی دستگاه ها می شوند، بلکه آسیب به محیط زیست را نیز به دنبال دارند. اما استفاده از امواج مایکروویو برای استخراج پکتین نه تنها مشکلات فوق الذکر را کاهش می دهد، بلکه مزایای دیگری نیز مانند زمان فرایند کوتاه، مصرف حلال کمتر، راندمان تولید بالاتر و کیفیت بهتر محصول تولیدی با صرف هزینه تولید کمتر را دنبال دارد (Bagherian et al., 2011). استفاده از امواج میکروویو با اهداف استخراج مؤثر ترکیبات خاص از مواد غذایی به منظور آنالیزها و کنترل کیفی و ایمنی آنها از دیگر اهدافی است که گروه تحقیقاتی حاضر به آنها توجه داشته است. اگرچه استفاده از این تکنیک استخراجی مستلزم سرمایه گذاری اولیه است اما استفاده از آن از مزیت عدم آسیب به ماکرومولکول ها و حفظ ساختار آنها و محافظت از ویژگی های حسی اولیه مواد غذایی برخوردار است که با فروش بیشتر محصول امکان بازگشت سریعتر سرمایه اولیه را ممکن می سازد. استخراج میکروویو آسپاراتام از نمونه های آدامس [۱۴] و استخراج برخی از فلزات سنگین از نمونه های روغن آفتابگردان، کانولا و سویا [۱۵-۱۶] نمونه هایی از تحقیقات گزارش شده در

پکتین مخلوط پیچیده ای از پلی ساکارید های موجود در دیواره های سلولی همه گیاهان بوده که بخش اعظم آن را گالاکتورونیک اسید و قندهای طبیعی مانند رامنوز، آرابینوز و گالاکتوز تشکیل می دهند [۲]. قسمت اعظم ساختار پکتین ستونی از اتصالات آلفا ۱ به ۴ گالاکتورونیک اسید بوده که به طور جزئی با متانول یا استیک اسید استری شده است [۳ و ۴]. درجه استریفیکاسیون (DE)<sup>۱</sup> درصد گروه های کربوکسیل استری شده با متانول) برای پکتین یکی از مهمترین پارامترها در جهت تعیین کاربرد آن می باشد [۵]. پکتین ها بسته به درجه استریفیکاسیون در دو گروه اصلی قرار می گیرند: پکتین با درجه استری بالا (HMP)<sup>۲</sup> با DE<sup>۳</sup> بیش از ۵۰ درصد و پکتین با درجه استری پایین (LMP)<sup>۳</sup> با DE<sup>۳</sup> کمتر از ۵۰ درصد [۴]. پکتین با درجه استری بالا در pH پایین (در محدوده ۳/۵ - ۲/۰) و غلظت بالای شکر (۷۵-۵۵ درصد) تشکیل ژل می دهند؛ در حالی که پکتین با درجه استری پایین می تواند در دامنه وسیعی از pH (در دامنه ۲ تا ۶) با و یا بدون حضور مقدار کمی شکر تشکیل ژل دهد، اما حضور یون های دو ظرفیتی مثل کلسیم برای این عمل ضروری می باشد [۶]. از جمله روش های سنتی بکار رفته برای استخراج پکتین می توان به استفاده از آب داغ اسیدی شده با انواع اسیدهای معدنی اشاره کرد. مشکل بودن کار با این روش، داشتن مشکلات زیست محیطی، طولانی بودن فرایند و پایین بودن کیفیت پکتین تولید شده از جمله معایب روش های سنتی بکار رفته است. این در حالی است که در بسیاری از محصولات غذایی به پکتین با کیفیت بالا و مناسب نیاز می باشد. پکتین به طور گسترده در صنعت غذا برای تولید مربا و ژله بعنوان ژل کننده، پایدارکننده و قوام دهنده مورد استفاده قرار می گیرد [۷]. همچنین، پکتین با درجه استری پایین ممکن است بعنوان ژل کننده در محصولات کم کالری تولید شده برای افراد مبتلا به دیابت و چاقی مورد استفاده قرار گیرد [۸]. از مهمترین منابع تجاری مورد استفاده برای تولید پکتین می توان به پوست مرکبات، تفاله سیب و چغندر قند اشاره کرد [۹]. همچنین، پکتین تاکنون از منابع غیر تجاری زیادی به

1. Degree of esterification
2. High-Methoxyl Pectin
3. Low-Methoxyl Pectin

## 4. Pea, Green pea

پکتین، اتانول با نسبت برابر اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت در یخچال نگهداری شد. در مرحله بعد، پکتین مرطوب تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در نهایت، راندمان تولید پکتین با توجه به معادله زیر محاسبه گردید:

$$(1) \quad \text{راندمان} (\%) = \frac{\text{وزن پکتین خشک}}{\text{وزن پودر خشک اولیه}} \times 100$$

## ۲-۲-۲- اندازه‌گیری درجه استریفیکاسیون

درجه استریفیکاسیون نمونه‌ها با روش Santos و همکاران (۲۰۱۳)، با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۱ گرم پکتین خشک به داخل ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شده و سپس با ۳ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط شد. در مرحله بعد، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و روی گرم‌کن مجهز به همزن مغناطیسی در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تا زمان حل شدن کامل پکتین به هم زده شد. ۵ قطره فنل فتالین به آن اضافه شده و با سدیم‌هیدروکسید ۰/۱ مولار تا ظهور رنگ صورتی کم‌رنگ تیرت گردید (حجم اولیه). سپس، ۱۰ میلی‌لیتر سدیم‌هیدروکسید ۰/۱ مولار اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه برای هیدرولیز بر روی همزن مغناطیسی به هم زده شد. در مرحله بعد، ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک‌اسید ۰/۱ مولار اضافه شده و تا از بین رفتن کامل رنگ صورتی به هم زده شد و سپس هیدروکلریک‌اسید باقی مانده با سدیم‌هیدروکسید ۰/۱ مولار تا ظهور رنگ صورتی تیرت شد (حجم ثانویه). درجه استریفیکاسیون با توجه به رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{حجم ثانویه}}{\text{حجم اولیه}} = \text{درجه استریفیکاسیون}$$

## ۲-۲-۳- اندازه‌گیری محتوای گالاتورونیک‌اسید

گالاتورونیک‌اسید با روش کالریمتریک با استفاده از معرف ۵،۳-دی‌متیل‌فنیل اندازه‌گیری شد [۱۷]. به لوله‌های آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول آبی پکتین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم پکتین بر میلی‌لیتر، ۶ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک/تتراپورات اضافه شد. سپس لوله‌های آزمایش در حمام آب-یخ به منظور سرد شدن قرار گرفت. بعد از مخلوط کردن نمونه‌ها، لوله‌ها به مدت ۶ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. بعد از سرد شدن نمونه‌ها در حمام آب-

زمینه بکارگیری امواج میکروویو در حوزه کنترل کیفی و ایمنی مواد غذایی هستند. هدف از این تحقیق استخراج پکتین از غلاف نخود فرنگی بعنوان یک منبع جدید با استفاده از امواج میکروویو و همچنین بهینه‌سازی شرایط فرایند برای دستیابی به حداکثر راندمان استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ می‌باشد. در ادامه نیز خصوصیات فیزیکی شیمیایی پکتین استخراجی مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

غلاف نخود فرنگی از فروشگاه‌های محلی در سطح شهر تهران خریداری شد. غلاف‌های تهیه شده بخوبی با آب شسته شده و پس از برش دادن با چاقو تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در یک آون معمولی قرار گرفتند. سپس، غلاف‌های خشک شده با استفاده از یک آسیاب بخوبی خرد شده و به منظور جداسازی ذرات درشت از مش -۴۰ عبور داده شدند. پودرهای بدست آمده به منظور انجام آزمایش‌های بعدی در کیسه‌های تیره رنگ و در مکانی خشک نگهداری شدند. سیتریک اسید، سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید، معرف فنل فتالین، سولفوریک اسید، سدیم تترا بورات و سدیم آزید از شرکت مرک آلمان و معرف متا هیدروکسی دی فنیل از شرکت سیگما آمریکا تهیه شدند.

### ۲-۲- آزمون‌ها

#### ۲-۲-۱- استخراج پکتین

برای استخراج پکتین از غلاف نخود فرنگی با استفاده از امواج میکروویو از روش Hosseini و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییر استفاده شد. بدین منظور پودر خشک غلاف در نسبت مایع به جامد برابر با ۱۵ وزنی/حجمی در محلول آبی حاوی اسید سیتریک (pH برابر با ۱، ۲ و ۳) ریخته شده و بهم زده شد. سپس محلول‌ها تحت فرایند استخراج در سه توان ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ وات و سه زمان ۱، ۲/۵ و ۴ دقیقه قرار گرفتند. پس از استخراج، مخلوط تا رسیدن به دمای اتاق سرد شده و به منظور جداسازی ذرات نامحلول از فیلتر کاغذی و سانتریفیوژ (g ۱۰۰۰۰، ۱۵ دقیقه) استفاده گردید. سپس، به منظور رسوب دادن

برای مطالعه پایداری امولسیون، نمونه‌های تولید شده، به مدت ۱ و ۳۰ روز در هر یک از دماهای ۲۳ و ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، این فاکتور با توجه به رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{حجم لایه امولسیون باقیمانده}}{\text{حجم لایه امولسیون اولیه}} = \text{درصد پایداری امولسیون}$$

### ۲-۲-۵- طیف FT-IR

طیف FT-IR با دقت ۴ بر سانتی‌متر و بوسیله اسپکترومتر FT-IR پرکین المر (Perkin Elmer Co., MA, USA) با استفاده از روش قرص پتاسیم برماید در دامنه ۴۰۰۰ تا ۴۵۰ بر سانتی‌متر رسم گردید.

### ۲-۲-۶- آنالیز آماری

در این مطالعه، جهت بهینه‌سازی اثر شرایط استخراج شامل سه متغیر  $X_1$  (توان، وات)،  $X_2$  (زمان، دقیقه) و  $X_3$  (pH) در سه سطح (۱، ۰، -۱) از روش سطح پاسخ و طرح باکس-بنکن استفاده شد. سطوح تخصیص داده شده به هر متغیر بر مبنای حدود تقریبی و دامنه کاربردی هر متغیر در حوزه استخراج پکتین از سایر مواد غذایی و بر مبنای انجام آزمایش‌های مقدماتی بوده است. سطوح و مقادیر واقعی هریک از متغیرهای مستقل، در جدول ۱ آمده است. آنالیز داده در سطح اطمینان ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار مینی تب ۱۶ انجام شد. تمام اشکال با استفاده از اکسل و دیزاین اکسپرت ۷، ترسیم شدند.

Table 1 Levels and values for independent variables

Variables		Assigned code and true values for variables		
		-1	0	+1
Power (watt)	( $X_1$ )	400	500	600
Time (min)	( $X_2$ )	1	2.5	4
pH	( $X_3$ )	1	2	3

(adjusted- $R^2$ ) برابر با ۹۷/۵۴ درصد بوده است، که این نشان دهنده برازش خوب مدل مورد استفاده با داده‌های تجربی می‌باشد. در مورد نتایج مربوط به درجه استریفیکاسیون همانطور که مشاهده می‌شود، مدل رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار بوده و همچنین آزمون عدم برازش معنی دار بود. نتایج آنالیز واریانس برای این پارامتر نیز مانند راندمان نشان از بالا بودن ضریب تبیین (۹۹/۱۸ درصد) و ضریب تبیین تعدیل شده (۹۷/۷۰ درصد) است، که نشان دهنده برازش خوب مدل

یخ، ۱ میلی‌لیتر معرف به هر یک از لوله‌های آزمایش اضافه شده و به هم زده شدند. سپس، حداکثر جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. با مقایسه مقدار جذب خوانده شده با منحنی استاندارد، مقدار گالاکتورونیک‌اسید محاسبه گردید. برای رسم منحنی استاندارد گالاکتورونیک‌اسید، از محلول D-گالاکتورونیک‌اسید در آب مقطر دیونیزه، رقت‌های مختلف تهیه شده (۲۵۰-۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، و جذب هر یک از آنها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس، نمودار جذب در مقابل غلظت رسم گردید.

### ۲-۲-۴- بررسی فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون

برای تخمین فعالیت امولسیفایری و ثبات امولسیون از روش Dalev و Simeonova (۱۹۹۵)، با کمی تغییر استفاده شد [۱۸]. برای تهیه امولسیون ۵ میلی‌لیتر روغن آفتاب‌گردان به ۵ میلی‌لیتر محلول پکتین ۵ درصد حجمی/وزنی (شامل ۰/۲ درصد سدیم‌آزید بعنوان ضد باکتری) اضافه شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها با هموژنایزر در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۴ دقیقه مخلوط شدند. سپس، امولسیون‌ها در شرایط دور ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. فعالیت امولسیفایری با توجه به رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{حجم لایه امولسیون شده}}{\text{حجم کل}} = \text{درصد فعالیت امولسیفایری}$$

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- آنالیز آماری

نتایج مربوط به آنالیز آماری در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که مدل رگرسیونی مربوط به راندمان استخراج در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار بوده و همچنین آزمون عدم برازش برای این پارامتر معنی نبود. همچنین ضریب تبیین ( $R^2$ ) برای این پارامتر برابر با ۹۹/۱۲ درصد و همچنین ضریب تبیین تعدیل شده

اثرات متقابل توان و pH معنی دار نبوده در حالیکه و اثرات درجه دوم هریک معنادار بوده است ( $p < 0.05$ ). معادلات درجه دو پیش‌بینی شده برای راندمان استخراج و درجه استریفیکاسیون که نوعی روابط ریاضی جهت دستیابی به شرایط بهینه با برقراری ارتباط بین متغیرها می‌باشند، بصورت کد شده در زیر آمده است:

$$\begin{aligned} \text{Yield (\%)} &= 3.80 + 1.00X_1 + 2.52X_2 - 2.87X_3 + 0.2X_1^2 + 1.95X_2^2 + 0.25X_3^2 + 0.65X_1X_2 + 0.45X_1X_3 \\ &\quad - 2.80X_2X_3 \\ \text{DE (\%)} &= 25.56 - 2.43X_1 + 4.39X_2 - 0.34X_3 - 0.90X_1^2 - 1.03X_2^2 + 0.04X_3^2 - 2.02X_1X_2 - 0.40X_1X_3 \\ &\quad - 0.27X_2X_3 \end{aligned}$$

می‌باشد [۱۷]. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که اثرات خطی فاکتورهای توان و زمان و اثر متقابل آنها، اثرات مربع توان و pH بر راندمان استخراج پکتین معنادار می‌باشد ( $p < 0.05$ ). در آزمون درجه استریفیکاسیون نیز اثرات خطی فاکتورهای توان مایکروویو و زمان مواجهه با امواج و تنها اثر مربع توان مایکروویو معنادار می‌باشد ( $p < 0.05$ ) و اثرات متقابل توان بر pH محیط معناداری نبوده است. در راندمان استخراج پکتین

**Table 2** Levels of variables (time, pH and power) and the related responses for extraction yield and degree of esterification

Runs	Independent variables			Measured responses		Estimated responses	
	Power (watt)	Time (min)	pH	Production yield (%)	Degree of esterification (%)	Production yield (%)	Degree of esterification (%)
1	400	1	2	5.4	19.44	5.07	19.64
2	600	1	2	5.6	18.36	5.77	18.83
3	400	4	2	9	32.94	8.82	32.46
4	600	4	2	11.8	23.76	12.12	22.55
5	400	2.5	1	8	27	8.07	27.06
6	600	2.5	1	9.6	23.22	9.17	23.02
7	400	2.5	3	2	27	2.42	27.20
8	600	2.5	3	5.4	21.60	5.32	21.53
9	500	1	1	4.8	20.52	5.05	20.25
10	500	4	1	15.6	29.16	15.70	29.56
11	500	1	3	6	20.52	5.90	20.11
12	500	4	3	5.6	28.08	5.35	28.35
13	500	2.5	2	5.2	24.84	5.80	25.56
14	500	2.5	2	6.2	25.92	5.80	25.56
15	500	2.5	2	6	25.92	5.80	25.56

مثبت روی راندمان استخراج می‌گذارد (شکل ۱). این نتیجه که توسط بسیاری از محققین تایید شده است [۲۰-۲۱]. ممکن است مربوط به افزایش نفوذ حلال به داخل ماتریکس ماده جامد در اثر افزایش زمان و در نتیجه ایجاد فرصت کافی برای حل شدن پکتین در حلال استخراج باشد [۲۰]. pH یکی از فاکتورهای کلیدی مؤثر بر راندمان استخراج می‌باشد و انتخاب pH مناسب برای رسیدن به حداکثر راندمان امری ضروری است. شکل ۱ به وضوح نشان می‌دهد که راندمان استخراج با کاهش pH افزایش می‌یابد. حلال استخراج با اسیدیته بالا سبب هیدرولیز پکتین‌های غیر محلول و تبدیل آنها به پکتین محلول شده و در نتیجه راندمان استخراج افزایش می‌یابد [۲۲-۲۳].

## ۲-۳- اثر شرایط استخراج روی راندمان تولید

### پکتین

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود توان مایکروویو یکی از مهمترین فاکتورهایی است که روی راندمان استخراج مؤثر بوده و سبب افزایش آن می‌شود. افزایش انرژی پرتو دهی مایکروویو می‌تواند سبب افزایش نفوذ حلال استخراج به داخل ماده جامد و افزایش فعل و انفعالات مولکول‌ها با میدان مغناطیسی شده و در نتیجه سبب افزایش انتشار پکتین از ماده جامد به حلال می‌شود [۱۹]. زمان پرتو دهی یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر راندمان استخراج پکتین می‌باشد. افزایش زمان پرتو دهی تاثیر

استخراج در این شرایط برابر با ۱۷/۱ درصد پیش بینی شده است. آزمون تائیدیه که شامل بررسی میزان راندمان استخراج در شرایط بهینه پیش بینی شده با سه تکرار بود، نشان داد که راندمان استخراج در این شرایط برابر  $0.43 \pm 0.16/95$  می باشد.

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، راندمان استخراج پکتین از غلاف نخود فرنگی در دامنه ۲ تا ۱۵/۶ درصد متغیر است. همچنین نتایج مربوط به بهینه سازی شرایط استخراج نشان داد که شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر راندمان استخراج در ۶۰۰ وات، زمان ۴ دقیقه و pH برابر با ۱/۰ بوده که راندمان

**Table 3** Analysis Variance (ANOVA) results for extraction yield and degree of esterification

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F value	P value
A) Extraction Yield					
Regression	9	152.074	16.897	62.58	0.000
Linearity	3	104.130	34.71	128.56	0.000
Second order	3	14.084	4.69	17.39	0.004
Cross-effects	3	33.86	11.29	41.80	0.001
Residual error	5	1.35	0.27		
Not fitted	3	0.79	0.26	0.94	0.552
Net error	2	0.56	0.28		
Total	14	153.424			
$r^2$			0.9912		
Adjusted-R <sup>2</sup>			0.9754		
B) Degree of esterification					
Regression	9	226.082	25.12	67.13	0.000
Linearity	3	202.152	67.38	180.06	0.000
Second order	3	6.58	2.19	5.86	0.043
Cross-effects	3	17.35	5.78	15.45	0.006
Residual error	5	1.87	0.37		
Not fitted	3	1.09	0.36	0.94	0.553
Net error	2	0.77	0.38		
Total	14	227.95			
$r^2$			0.9918		
Adjusted-R <sup>2</sup>			0.9770		

نتیجه گرفت پکتین بدست آمده در این روش استخراج از نوع پکتین با درجه استریفیکاسیون پایین (LMP) می باشد. همانطور که بیان شد پکتین با درجات استری متفاوت دارای کاربردهای متفاوتی می باشند. از این رو، پکتین بدست آمده از این محصول، بدلیل پایین بودن درجه استری آن، برای تولید محصولات با شکر کم مثل ژله ها و مرباهای کم کالری بسیار مناسب است [۸].

اثر زمان پرتو دهی، توان مایکروویو و pH روی درجه استریفیکاسیون در شکل ۱ آورده شده است. مطابق شکل ۱ با افزایش زمان پرتو دهی و pH درجه استریفیکاسیون افزایش می یابد. این نتیجه در گزارشات بسیاری از محققین مشاهده شده است [۲۵-۲۴]. توان مایکروویو یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر روی راندمان استخراج می باشد. توان استخراج از یک طرف با افزایش تحرک مولکولی در درون ماده غذایی و افزایش گرادیان

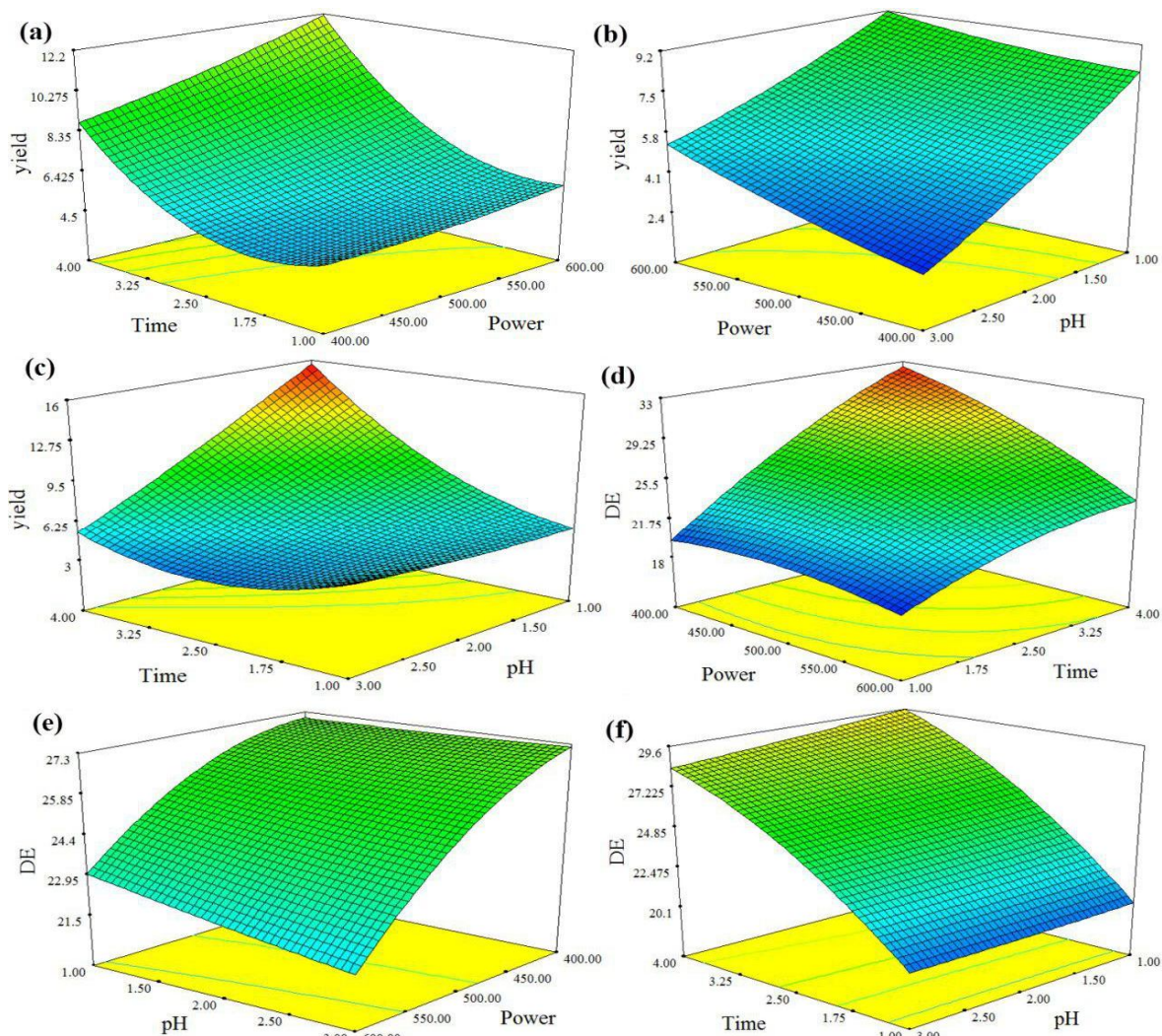
### ۳-۳- اثر شرایط استخراج بر درجه

#### استریفیکاسیون

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود نتایج درجه استریفیکاسیون در این پژوهش بین ۱۸/۳۶ و ۳۲/۹۴ درصد متغیر بوده است. همچنین، درجه استریفیکاسیون پکتین استخراج شده در شرایط بهینه (توان ۶۰۰ وات، زمان ۴ دقیقه و pH برابر با ۱/۰) برابر با ۲۳ درصد بود که این نشان می دهد پکتین بدست آمده از غلاف نخود فرنگی را می توان جزو پکتین های با درجه استری پایین طبقه بندی کرد. این نتایج نشان می دهد که بین درجه استریفیکاسیون و راندمان استخراج رابطه مستقیمی وجود ندارد؛ زیرا بالاترین راندمان استخراج مربوط به شرایط بهینه استخراج بود؛ درحالی که درجه استریفیکاسیون در این شرایط در بیشترین حد نبوده است. بر اساس نتایج بدست آمده می توان

آزمایشاتی که در آن‌ها از شرایط بسیار سخت (توان بالا، زمان طولانی و pH بسیار پایین) برای استخراج استفاده شده است، دارای درجه استریفیکاسیون پایین‌تری می‌باشند؛ زیرا شرایط سخت استخراج سبب افزایش استر زدایی زنجیره‌های پکتین می‌شود [۲۶].

دمایی از درون به سطح سبب آزاد شدن مولکول‌ها و بهبود راندمان استخراج می‌شود و از طرف دیگر با افزایش سرعت هیدرولیز پیوندهای استری در اثر افزایش توان و دما می‌تواند درجه استریفیکاسیون را کاهش دهد که این به وضوح در شکل ۱ نشان داده شده است [۶]. بطور کلی پکتین بدست آمده از



**Fig 1** The effect of independent variables on extraction yield and esterification degree for pectin

را تخمین زد [۲۷]. همه انواع پکتین با محتوای بالای گالاکتورونیک اسید توصیف می‌شوند و با توجه به نظر سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) و اتحادیه اروپا (EU) پکتین باید حداقل ۶۵ درصد گالاکتورونیک اسید داشته باشد [۲۴].

در این مطالعه، درصد گالاکتورونیک اسید پکتین استخراج شده در شرایط بهینه (توان ۶۰۰ وات، زمان ۴ دقیقه و pH برابر با

#### ۳-۴- درصد گالاکتورونیک اسید

در بعضی از منابع علمی از پکتین به عنوان گالاکتورونانس یا رامنوگالاکتورونانس نام برده می‌شود، به این دلیل که پکتین‌ها بیوپلیمرهای پیچیده‌ای هستند که به طور غالب متشکل از گالاکتورونیک اسیدهایی که به طور جزئی متیله شده‌اند، می‌باشند. با توجه به اینکه گالاکتورونیک اسید ترکیب اصلی پکتین است، با تعیین مقدار آن می‌توان خلوص پکتین رسوب داده شده با الکل

که پکتین استخراج شده از نارنج در شرایط بهینه، دارای خلوص مطلوبی می باشد [۴].

### ۵-۳- خصوصیات امولسیفایری

در مطالعه حاضر، فعالیت امولسیفایری پکتین استخراج شده در شرایط بهینه (توان برابر با ۶۰۰ وات، زمان برابر با ۴ دقیقه و pH برابر با ۱/۰) و همچنین پایداری امولسیون حاصل از روغن و محلول ۰/۵ درصدی پکتین اندازه گیری گردید و در جدول ۴ نشان داده شده است. بعد از تهیه امولسیون، ۳ فاز قابل تشخیص مشاهده شد: فاز روغن با چگالی کمتر در بالا، فاز محلول پکتین با چگالی بیشتر در پایین و فاز امولسیونی با چگالی متوسط در وسط. میزان فعالیت امولسیفایری که بنا به تعریف، حجم لایه امولسیونی بر حجم کل می باشد برابر با ۳۸ درصد بود. این میزان فعالیت امولسیفایری کمتر از میزان گزارش شده در مورد پکتین تفاله هویج (حدود ۶۰ درصد) بود [۲۹]. پایداری امولسیونی در دماهای ۴ و ۲۳ درجه سلسیوس به ترتیب بعد از ۱ روز برابر با ۷۷/۸ و ۶۶/۷ درصد، و بعد از ۳۰ روز برابر با ۷۷/۶ و ۶۶/۱ درصد بود (جدول ۴). با توجه به نتایج بدست آمده می توان بیان داشت که پایداری امولسیون ها در هر دو دمای مورد آزمایش مطلوب بود اما امولسیون ها در دمای ۴ درجه سلسیوس مقداری پایدارتر بودند. این نتایج مشابه گزارشات بسیاری از محققین می باشد [۴].

اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که درصد گالاکتورونیک اسید در این شرایط بهینه برابر با  $1/2 \pm 69/23$  درصد بوده است. این نتیجه مشابه نتایج گزارش شده توسط برخی از دیگر محققین می باشد. در تحقیق دیگری که در این زمینه انجام شد، میزان گالاکتورونیک اسید پکتین استخراجی از پوست نارنج در حدود ۷۵/۷ درصد بود که این مقدار تقریباً مشابه با میزان بدست آمده در تحقیق حاضر است [۲۸]. محققین دیگری ویژگی های فیزیکوشیمیایی پکتین استخراج شده با کمک اسیدهای مختلف از تفاله چغندر قند را مورد بررسی قرار داده و بیان داشتند که میزان گالاکتورونیک اسید در پکتین های استخراج شده، بر حسب نوع اسید متفاوت و در دامنه ۷۷/۸-۶۰/۲ درصد است [۲۲]. این محققین نوع اسید و pH را مهمترین عامل مؤثر بر درصد گالاکتورونیک اسید معرفی کرده و بیان داشتند، هر چه اسید مورد استفاده برای استخراج پکتین قویتر باشد درصد گالاکتورونیک اسید نیز بیشتر خواهد بود. در تحقیقی دیگر توسط Yapo و همکاران (۲۰۰۷)، درصد گالاکتورونیک اسید پکتین استخراج شده از تفاله چغندر قند را در دامنه ۷۶/۳-۳۵/۲ درصد گزارش کرده و بیان داشتند که مهمترین عامل مؤثر بر میزان گالاکتورونیک اسید، pH بود؛ بطوری که با کاهش pH، درصد گالاکتورونیک اسید افزایش یافت. در نتیجه، می توان بیان داشت

Table 4 Emulsification activity and emulsion stability oil/0.5% v/w pectin solution

emulsion stability				Emulsification activity	
2 day		1 day		Storage time	
23	4	23	4	23	Temperature (°C)
66.1	77.6	66.7	77.8	38.0	Pectin

ساختار پلیمر گالاکتورونیک اسید است. پیک ظاهر شده در نوار ۲۹۲۲ بر سانتی متر مربوط به ارتعاشات کششی آلیفاتیک C-H می باشد که شامل ارتعاشات خمشی و کششی گروه های CH، CH<sub>2</sub> و CH<sub>3</sub> است (حسینی و همکاران، ۱۳۹۵). به همین ترتیب، نوار ظاهر شده در ۱۷۴۳ مربوط به ارتعاشات O-CH<sub>3</sub> می باشد. گروه های کربوکسیلات دارای دو پیک هستند: (۱) ارتعاشات کششی نامقارن در ۱۶۳۰ بر سانتی متر، (۲) ارتعاشات کششی متقارن ضعیف تر در ۱۴۳۸ بر سانتی متر. مجموع پیک های

### ۶-۳- طیف FT-IR

یکی از راه های معتبر برای شناسایی ساختار پکتین استخراجی، استفاده از طیف FT-IR است. طیف حاصل از سامانه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مربوط به نمونه پکتین استخراجی از غلاف نخود فرنگی در شرایط بهینه (توان برابر با ۶۰۰ وات، زمان برابر با ۴ دقیقه و pH برابر با ۱/۰) در شکل ۲، نشان داده شده است. ناحیه جذبی قوی بین ۳۵۰۰-۳۳۰۰ بر سانتی متر مربوط به گروه های عاملی OH موجود در قسمت های مختلف



نمونه با ساختار پکتین، دستیابی به محصول استخراجی مورد تأیید قرار گرفت.

ناحیه بین ۱۲۰۰ و ۸۰۰ ناحیه اثر انگشت نامیده می شوند این ناحیه که تفسیر نوارهای آن با مشکلاتی نیز همراه است [۵] با کتابخانه دستگاه مطابقت داده شده و پس از تأیید و مطابقت

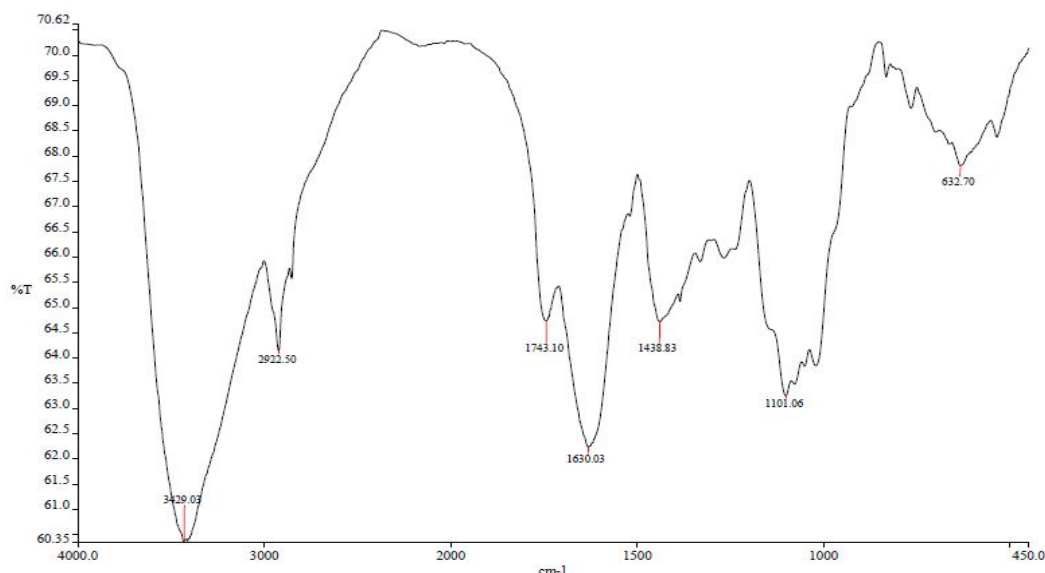


Fig 2 FT-IR spectrum for pectin obtained from peas pod in optimized extraction conditions

استخراجی در شرایط مذکور برابر با ۳۸ درصد بود و همچنین پایداری امولسیون پکتین حاصل از روش‌های مختلف استخراج، در هر دو دمای ۴ و ۲۳ درجه سلسیوس مناسب بوده است. اما به هر حال میزان پایداری امولسیون در دمای ۴ درجه سلسیوس اندکی بیشتر بود.

#### ۵- منابع

- [1] Axelos, M.A.V, Thibault, J., and Lefebvre, J. 1989. Structure of citrus pectins and viscometric study of their solution properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 11(3):186-191.
- [2] Basanta, M.F., Ponce, N.M.A., Rojas, A.M., and Stortz, C.A. 2012. Effect of extraction time and temperature on the characteristics of loosely bound pectins from Japanese plum. *Carbohydrate Polymers*, 89(1):230-235.
- [3] Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., and Liu, D. 2014. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of

#### ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، از روش استخراج به کمک امواج مایکروویو برای تولید پکتین از غلاف نخود فرنگی به عنوان یک منبع جدید استفاده شد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و کاربردی پکتین استخراجی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بازده استخراج پکتین حاصل از استخراج به کمک امواج مایکروویو در دامنه ۲ تا ۱۵/۶ درصد بود. همچنین بازده پکتین استخراجی در شرایط بهینه استخراج (توان ۶۰۰ وات، زمان ۴ دقیقه و pH برابر با ۱/۰) برابر با ۱۷/۱ درصد پیش بینی شد. آزمون تأییدیه که شامل بررسی میزان راندمان استخراج در شرایط بهینه پیش بینی شده با سه تکرار بود نشان داد که راندمان استخراج در این شرایط برابر  $۱۶/۹۵ \pm ۰/۴۳$  درصد بود. علاوه بر این، درجه استریفیکاسیون پکتین حاصل در دامنه ۱۸/۳۶ و ۳۲/۹۴ درصد بود که نشان داد پکتین غلاف نخود فرنگی را می توان در گروه پکتین با درجه استری پایین طبقه بندی کرد. از طرف دیگر، درصد گالاکتورونیک اسید پکتین استخراجی در شرایط بهینه استخراج برابر با  $۱/۴۳۲ \pm ۶۹/۲۳$  درصد بود. فعالیت امولسیفایری پکتین

- consumption of some imported chewing gums by microwave digestion and high performance liquid chromatography analysis. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(3):1649-1658.
- [15] Akbari-adergani, B. Ezzeddin, M. Hashemi Mogaddam, H. and Shoeibi, Sh. 2015. Effect of production process on concentration of lead and arsenic in sunflower oil. *J Mazandaran Univ. Med. Sci.* 25(127): 38-48.
- [16] Akbari-adergani, B. Ahmadi, M. Ezzeddin, M. and Hadiani, R. 2015. Effect of various stages in treatment process on concentration of lead and arsenic in canola oil. *J of food processing and Production.* 6(3): 1-8.
- [17] Hosseini, S.S., Khodaeian, F., and Yarmand, M.S. 2016. Effect of acid extraction conditions on yield and quality characteristics of pectin from sour orange peel. *Iranian journal of biosystem engineering.* 47(2): 231-242.
- [18] Dalev, P.G., and Simeonova, L.S. 1995. Emulsifying properties of protein-pectin complexes and their use in oil - containing foodstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68(2): 203-206.
- [19] Yan, M.-M., Liu, W., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Chen, C.-Y., and Luo, M. 2010. Optimisation of the microwave-assisted extraction process for four main astragalosides in *Radix Astragali*. *Food Chemistry*, 119(4): 1663-1670.
- [20] Samavati, V. 2013. Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 95(1): 588-597.
- [21] Li, D., Jia, X., Wei, Z., and Liu, Z. 2012. Box-Behnken experimental design for investigation of microwave-assisted extracted sugar beet pulp pectin. *Carbohydrate Polymers*, 88(1): 342-346.
- [22] Ma, S., Yu, S., Zheng, X., Wang, X., Bao, Q.-D., and Guo, X. 2013. Extraction, characterization and spontaneous emulsifying properties of pectin from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers*, 98(1): 750-3.
- [23] Maran, J. P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., and Sridhar, R. 2013. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97(2): 703-709.
- pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126:72-81.
- [4] 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. *Food Chemistry*, 100(4):1356-1364.
- [5] Santos, J. D. G., Espeleta, A. F., Branco, A., and de Assis, S.A. 2013. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 92(2):1997-2001.
- [6] Hosseini, S.S., Khodaiyan, F., and Yarmand, M.S. 2016. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 140:59-65.
- [7] Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y., and Yao, J. 2010. Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresource Technology*, 101(9): 3268-3273.
- [8] Wai, W. W., Alkarkhi, A. F. M., and Easa, A. M. 2010. Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2):209-214.
- [9] Mesbahi, G., Jamalain, J., and Farahnaky, A. 2005. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids*, 19(4):731-738.
- [10] Pagan, J., and Ibarz, A. 1999. Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. *Journal of Food Engineering*, 39(2):193-201.
- [11] Maran, J.P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., and Sridhar, R. 2014. Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydrate Polymers*, 101:786-791.
- [12] Kalapathy, U., and Proctor, A. 2001. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. *Food Chemistry*, 73(4):393-396.
- [13] Qiu, L., Zhao, G., Wu, H., Jiang, L., Li, X., and Liu, J. 2010. Investigation of combined effects of independent variables on extraction of pectin from banana peel using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 80(2):326-331.
- [14] Rasouli, Z., and Akbari-adergani, B. 2016. Assessment of aspartame exposure due to

- [27] Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Cornet, C., Nott, K., Legros, H., Wathelet, B. and Paquot, M. 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(1): C001-C009.
- [28] Ebrahimzadeh, M.A., and Azadbakht, M. 2006. Extraction of pectin and comparison of yield, esterification degree and galactorunic acid in some citrus skin. *J Mazandaran Univ. Med. Sci.* 16(54):52-59.
- [29] Jafari, F., Khodaiyan, F., Kiani, H., and Hosseini, S.S. 2017. Pectin from carrot pomace: Optimization of extraction and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 157: 1315-1322.
- [24] Bagherian, H., Ashtiani, F. Z., Fouladitajar, A., and Mohtashamy, M. 2011. Comparisons between conventional, microwave-and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11): 1237-1243.
- [25] Kratchanova, M., Pavlova, E., Panchev, I., and Kratchanov, C. 1996. Influence of microwave pretreatment of fresh orange peels on pectin extraction. *Progress in Biotechnology*, 14: 941-946.
- [26] Mort, A. J., Qiu, F., and Maness, N. O. 1993. Determination of the pattern of methyl esterification in pectin. Distribution of contiguous nonesterified residues. *Carbohydrate Research*, 247: 21-35.

## Optimization of microwave-assisted extraction of pectin from peas pod by response surface method

Bahramipour, M.<sup>1</sup>, Akbari-adergani, B.<sup>2\*</sup>

1. M.Sc. in Food Science and Technology, Department of Food Science & Engineering, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Associate Professor, Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

(Received: 2017/08/02 Accepted:2018/04/23)

In the present study the response surface methodology (RSM) and BOX-Behnken design were used to optimize the microwave-assisted extraction of pectin from peas (*Pisum sativum* L.) pod as a new source. The effect of some variables such as microwave power, time of irradiation and pH on some physicochemical and functional properties of extracted pectin i.e. galacturonic acid content, degree of esterification, emulsifying properties, stability of emulsion and behavior of FT-IR spectra were investigated. The results showed that the extraction yield was between 2-15.6%. Moreover, the extraction yield at optimum extraction conditions (microwave power of 600 W, extraction time of 4 min and pH of 1.0) was 17.1%. The result was obtained under optimized experimental conditions in triplicate and the mean values ( $16.93 \pm 0.43$ ) obtained from real experiments, demonstrated the validation of the optimized conditions. Degree of esterification (DE) values for pectin ranged from 18.36 and 32.94 and it was 23% under optimum condition. The galacturonic acid content and emulsion activity of the extracted pectin under optimal conditions also were  $69.23 \pm 1.432\%$  and 38%, respectively. In addition, the stability of pectin-stabilized emulsion was good at 4°C and 23°C.

**Keywords:** Pectin, Peas pod, Optimization, Response Surface Method

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: [analystchemist@yahoo.com](mailto:analystchemist@yahoo.com)