

Evaluation of the response surface methodology on melting point and gelling temperature of carrageenan extracted from *Hypnea flagelliformis*

Mohammad Entesarian¹, Seyed Mahdi Ojagh^{*2}, Moazameh Kordjazi³

1. Ph.D. Student in Sea Food Processing, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: m.entesarian@chmail.ir
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Sea Food Processing, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mahdi_ojagh@yahoo.com
3. Assistant Prof., Dept. of Sea Food Processing, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: kordjazi.m@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Extension Paper

Article history:

Received: 03.14.2023

Revised: 10.24.2023

Accepted: 10.31.2023

Keywords:

Carrageenan,
Gelling temperature,
Hypnea Flagelliformis,
Melting point,
RSM

ABSTRACT

Carrageenan is a marine biopolymer that can be extracted from cell wall of some red carrageenophyte. In this study, response surface methodology was used to investigate the procedure of carrageenan melting point and gelling temperature from *Hypnea flagelliformis*. Independent variables, alkalinity concentration (0.25-2%), extraction temperature (70-90 °C) and extraction time (60-240 minutes) were applied in five levels. Base on the result, effects of all independent variables on melting point were significant ($P < 0.05$). The NaOH concentration had a significant effect on gelling temperature ($P > 0.05$). Polynomial models developed for the melting point and gelling. Optimum data for independent variables were alkalinity concentration 1.54%, temperature 85 °C and time 203 minutes. Confirmatory test was earned as follows melting point 63.8 ± 0.91 °C and gelling temperature 37.29 ± 0.62 °C. The experimental data and model forecasting were similar ($P > 0.05$).

Cite this article: Entesarian, Mohammad, Ojagh, Seyed Mahdi, Kordjazi, Moazameh. 2023. Evaluation of the response surface methodology on melting point and gelling temperature of carrageenan extracted from *Hypnea flagelliformis*. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 12 (3), 147-158.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2023.21192.1763

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ارزیابی روش سطح پاسخ بر تغییرات نقطه ذوب و دمای ژله‌ای کاراگینان *Hypnea flagelliformis* استخراج شده از

محمد انتصاریان^۱، سید مهدی اجاق^{۲*}، معظمه کردجزی^۳

۱. دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: m.entesarian@chmail.ir
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: mahdi_ojagh@yahoo.com
۳. استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: kordjazi.m@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - ترویجی	بیوپلیمر دریایی کاراگینان از دیواره سلولی کارژینوفیت‌های قرمز استخراج می‌گردد. در این پژوهش تأثیر شرایط مختلف استخراج بر نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل کاراگینان استحصالی از کارژینوفیت <i>Hypnea flagelliformis</i> با روش رویه سطح پاسخ (RSM) مورد بررسی قرار گرفت. بازه متغیرهای ورودی شامل غلظت سدیم هیدروکسید (۲-۲۵٪) درصد (w/v)، دمای استخراج (۹۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان استخراج (۲۴۰-۶۰ دقیقه) در ۵ سطح بودند. مطابق با نتایج، تمامی متغیرهای ورودی بر نقطه ذوب معنادار بودند ($P < 0.05$). غلظت قلیا تنها متغیر خطی ورودی بر دمای تشکیل ژل کاراگینان بود. تعیین نقطه بهینه برای نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل با مدل چندجمله‌ای محاسبه گردید. مقادیر بهینه متغیرهای مستقل با استفاده از روش تابع مطلوب برای غلظت قلیا، دما و زمان استخراج به ترتیب ۱/۵۴ درصد، ۸۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۳ دقیقه بودند. آزمایش‌های تأییدی برای نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل به ترتیب $63/81 \pm 0/91$ درجه سانتی‌گراد و $37/29 \pm 0/62$ درجه سانتی‌گراد به دست آمدند. تطابق مقادیر واقعی با مقادیر پیشنهادی بیانگر توانمندی مدل بود ($P > 0.05$).
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۲	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹	
واژه‌های کلیدی: جلبک <i>Hypnea flagelliformis</i> دمای تشکیل ژل، کاراگینان، نقطه ذوب	

استناد: انتصاریان، محمد، اجاق، سید مهدی، کردجزی، معظمه (۱۴۰۲). ارزیابی روش سطح پاسخ بر تغییرات نقطه ذوب و دمای ژله‌ای کاراگینان استخراج شده از *Hypnea flagelliformis*. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۲ (۳)، ۱۵۸-۱۴۷.

DOI: 10.22069/japu.2023.21192.1763



© نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

بهره‌برداری بهینه از جلبک‌های دریایی و ترکیبات حاصل از آنها، موضوع گسترده‌ای است که مورد توجه پژوهش‌گران و صنعتگران قرار گرفته است. یکی از پرکاربردترین این ترکیبات استحصالی، پلیمر دریایی کاراگینان می‌باشد. این پلیمر زیستی که نوعی پلی‌ساکارید سولفاته است از جلبک‌های قرمز استخراج می‌گردد. جلبک‌های دریایی مانند *Hypnea spp.*، *Euclima denticulata*، *Kappaphycus alvarezii*، *Euclima cottonii* و *Euclima spinosum* که اصطلاحاً کارژینوفیت نیز نامیده می‌شوند، پتانسیل تولید کاراگینان را دارند (۱).

این ترکیب دریایی به عنوان عامل تغلیط‌کنندگی (۲)، ژله‌ای (۳)، امولسیفایری (۴ و ۵)، دارای کارکردهای بیولوژیکی، بیوتکنولوژیکی و صنعتی متنوعی می‌باشد. بنابراین می‌تواند نقش مهمی را در صنایع مختلف غذایی، دارویی، آرایشی، بهداشتی و زیست فناوری ایفا نماید. اخیراً بهره‌گیری از کاراگینان در مواردی مانند رهش دارو، مهندسی بافت و هم‌چنین کاربردهای بیوسنسوری آن نیز رو به افزایش می‌باشد (۶ و ۷) خواص زیست‌فعالی حاصل از این بیوپلیمر و کارژینوفیت آن مانند ضد توموری (۸)، ضد انعقادی (۹)، ضد درد و ضد دیابتی (۱۰)، نیز بر توسعه کاربری آن افزوده است.

بررسی منابع نشان می‌دهد که کارژینوفیت‌های متنوع، روش‌های مختلف استخراج، پارامترهای متفاوت در این زمینه مورد پژوهش قرار گرفته است. به‌عنوان نمونه کاراگینان استحصالی از گونه *Kappaphycus alvarezii* با متدولوژی سطح پاسخ مورد بهینه قرار گرفت (۱۷). پژوهش دیگری نشان داد که نقطه ذوب به‌طور قابل‌توجهی تحت‌تأثیر غلظت NaOH و اثر متقابل غلظت قلیا و زمان می‌باشد. بالاترین نقطه ذوب با غلظت ۴ درصد

NaOH و زمان ۲/۵ ساعت بود. در حالی که دمای استخراج پارامتر مؤثر بر تشکیل دمای ژله‌ای بود (۳۰).

پژوهش‌ها نشان می‌دهد که پس از گذشت چندین دهه هم‌چنان مطالعات بر روی این بیوپلیمر دریایی ادامه دارد به ویژه که مقالات نمایه شده به طور پیوسته از دهه گذشته نیز رو به افزایش می‌باشد. از طرفی سالانه مبلغی بالغ بر ۶۲۶ میلیون دلار جهت تجارت کاراگینان هزینه می‌گردد، که حجم برآورد شده از فروش این هیدروکلویید در سال ۲۰۱۵ برابر با ۶۰ هزار تن بوده است که هر ساله یک رشد نسبتاً ثابت ۵ درصدی را نیز طی دو دهه نشان می‌دهد (۱۱، ۱۲ و ۱۳). بنابراین می‌توان دریافت به علت گستردگی کاربرد این بیوپلیمر دریایی مطالعه بر روی کارژینوفیت‌های مختلف و متدولوژی استخراج بر تولید بهینه صنعتی این بیوپلیمر کمک شایانی خواهد نمود. بنابراین با توجه به مطالب عنوان شده، در این پژوهش اثر پارامترهای استخراج مانند غلظت سدیم هیدروکسید، مدت و زمان استخراج بر روی نقطه ذوب و دمای شکل ژل کاراگینان بررسی گردید.

مواد و تجهیزات آزمایشگاهی: کارژینوفیت *H. flagelliformis* از سواحل جنوبی استان هرمزگان تهیه گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده (سدیم هیدروکسید، دی‌هیدروژن پتاسیم فسفات و دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات) از شرکت شارلو تهیه شدند. تجهیزاتی چون حمام آب، خشک‌کن حرارتی، آسیاب صنعتی، pH متر مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی کارژینوفیت: با استفاده از کلید شناسایی معتبر (۱۰) اطلس جلبک‌ها و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی کارژینوفیت *Hypnea flagelliformis* در پاییز از نوار ساحلی بندرعباس - سواحل سورو - تهیه شدند. اقدامات لازم جهت فرآیند خشک کردن

شست و شوی نهایی عملیات استخراج از جلبک‌های پیش‌تیماریافته، در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در محدوده دمایی و زمانی تعیین شده (جدول ۱)، در بن ماری انجام گرفت. pH موردنظر نیز با اسید کلریدریک ۱۰ درصد در محدوده ۸-۹ تنظیم گردید، سپس با عبور از پارچه، فیلتر شده و پس از صاف کردن، عصاره‌ها تغلیظ شده و با اتانول ۹۵ درصد ترسیب شدند. سرانجام با دستگاه آون درایر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۲۴-۲۰ ساعت خشک شد (۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷).

نمونه‌ها صورت پذیرفت (۱۱ و ۱۲)، سپس با دستگاه آسیاب صنعتی پودر شده و در کیسه‌های پلی‌اتیلن نگهداری شدند (۱۳).

فرآیند استخراج کاراگینان: به منظور فرآیند استخراج ۱۰ گرم از کارژینوفیت پودر شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای مدت زمان ۱۲ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار گرفت. فرآیند پیش‌تیمار قلیایی سدیم هیدروکسید در پنج نقطه غلظتی (w/v) در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴ ساعت انجام شد. به منظور حذف قلیای مازاد با آب مقطر شست و شو گردید. پس از

جدول ۱- محدوده آزمایشی متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی ($\alpha=1/682$).

آزمایش‌ها					محدوده	علامت	متغیرهای مستقل
+ α	+۱	۰	-۱	- α			
۲	۱/۶۵	۵	۰/۶	۱/۲۵	۰/۲۵-۲	A	غلظت قلیا (% w/v)
۹۰	۸۵	۸۰	۷۵	۷۰	۷۰-۹۰	B	دما (درجه سانتی‌گراد)
۲۴۰	۲۰۵	۱۵۰	۹۵	۶۰	۶۰-۲۴۰	C	زمان (دقیقه)

سانتی‌گراد در لوله آزمایش (ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۱۵ میلی‌متر) قرار گرفت. یک گوی (وزن ۲۰ میلی‌گرم، قطر ۷ میلی‌متر) بر روی سطح ژل قرار داده شد. لوله آزمایش نیز در بن ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. دمای بن ماری تا لحظه سقوط گوی رو به افزایش بود. بنابراین دمایی که گوی به کف لوله آزمایش سقوط نمود، با ترمومتر اندازه‌گیری و به عنوان نقطه ذوب ژل گزارش گردید.

طرح آزمایش و آنالیز آماری: در این پژوهش برای طراحی آزمایش، آنالیز نتایج و بهینه‌سازی از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت^۱ استفاده شد. بدین‌منظور از طرح چرخشی مرکب مرکزی^۲ (CCRD) برای ۳ متغیر

تعیین نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل: پس از تهیه محلول ۱/۵ درصد w/v کاراگینان در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، تعیین نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل مطابق با روش مندوزا و همکاران (۲۰۰۶)، صورت پذیرفت (۱۸).

برای ثبت دمای ژله‌ای، محلول کاراگینان در لوله آزمایش (ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر و قطر ۱۵ میلی‌متر) قرار گرفت. سپس یک گوی (وزن ۶ میلی‌گرم، قطر ۱۰ میلی‌متر) درون لوله رها شد. لوله درون حمام آبی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تکان داده تا حرکت گوی متوقف گردد. سپس دما با یک دماسنج دقیق به عنوان دمای تشکیل ژل ثبت شد.

جهت اندازه‌گیری نقطه ذوب ژل، محلول کاراگینان به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه

1- Design-Expert 7.01 (Stat-Ease, Inc, Minneapolis, MN, USA)

2- Central Composite Rotatable Design

در رابطه بالا، Y نشان‌دهنده مقدار متغیرهای وابسته، K نمایانگر تعداد متغیرهای مستقل، $\beta_0, \beta_i, \beta_{ij}, \beta_{ij}$ ضرایب مدل رگرسیون و x_i, x_j متغیرهای مستقل و ε خطای احتمالی است (۱۹). برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای وابسته در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل، نمودار سطح پاسخ آن‌ها به وسیله این نرم‌افزار ترسیم شدند. به منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش داده شده، آزمون عدم برازش^۱ ضرایب R^2 تعیین شدند (۲۰).

مستقل در ۵ سطح انجام گردید. کد گذاری ماتریس طرح شده با مؤلفه‌های واقعی با ۸ نقطه فاکتوریل و ۶ نقطه محوری در جدول ۲ آورده شده است. در این طرح بین متغیر وابسته (Y) و متغیرهای مستقل (x_i) با مدل رگرسیونی درجه دوم به صورت تابعی از متغیرهای مستقل بیان شدند:

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

جدول ۲- کدگذاری ماتریس طرح مرکب مرکزی.

C	B	A	Type	
۰	۰	۰	Center	۱
۰	۰	۰	Center	۲
۰	۰	۰	Center	۳
۰	۰	۰	Center	۴
۰	۰	۰	Center	۵
۰	۰	۰	Center	۶
-۱	-۱	-۱	Fact	۷
-۱	-۱	۱	Fact	۸
-۱	۱	-۱	Fact	۹
-۱	۱	۱	Fact	۱۰
۱	-۱	-۱	Fact	۱۱
۱	-۱	۱	Fact	۱۲
۱	۱	-۱	Fact	۱۳
۱	۱	۱	Fact	۱۴
۰	۰	-۱/۶۸۲	Axial	۱۵
۰	۰	۱/۶۸۲	Axial	۱۶
۰	-۱/۶۸۲	۰	Axial	۱۷
۰	۱/۶۸۲	۰	Axial	۱۸
-۱/۶۸۲	۰	۰	Axial	۱۹
۱/۶۸۲	۰	۰	Axial	۲۰

A: غلظت قلیا (درصد)، B: دمای استخراج (درجه سانتی‌گراد)، C: زمان استخراج (دقیقه)

1- Lack of fit

نتایج و بحث

اثر شرایط مختلف استخراج بر دمای تشکیل ژل: آنالیز واریانس به دست آمده (جدول ۳) نشان می‌دهد که از بین متغیرهای ورودی، اثر قلیا (A) به تنهایی تأثیری معناداری بر روی دمای تشکیل ژل کاراگینان نداشته است ($P < 0/05$). اگرچه اثر هم‌زمان قلیا و دما

(AB) و مجذور زمان (C^2) اثر معناداری بر دمای تشکیل ژل داشته است. پس از تأیید مدل از نظر میزان دقت (جدول ۴)، تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه انجام گرفت و مدل رگرسیون ریاضی آن محاسبه گردید (جدول ۵) که ضرایب بالای R^2 نشان از رضایت‌بخشی مدل می‌باشد.

جدول ۳- نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس پاسخ دمای تشکیل ژل.

منبع تغییرات	جمع مربعات	مربع میانگین	درجه آزادی	F-value	p-value
مدل رگرسیون	۸۵/۴۸	۹/۵۰	۹	۱۸/۸۸	$0/0001 >$
باقیمانده	۵/۰۳	۰/۵۰	۱۰		
عدم برازش Y_1	۲/۱۹	۰/۴۴	۵	۰/۶۳	۰/۶۱۰۰
خطای خالص	۲/۸۴	۰/۵۷	۵		
Cor total	۹۰/۵۱		۱۹		
مدل رگرسیون	۵۲۸/۳۱	۵۸/۷۰	۹	۴۵/۶۳	$0/0001 >$
باقیمانده	۱۰/۳۰	۱/۰۳	۱۰		
عدم برازش Y_2	۸/۴۲	۱/۶۸	۵	۰/۲۹	۰/۰۶۲۷
خطای خالص	۱/۸۸	۰/۳۸	۵		
Cor total	۵۳۸/۶۱		۱۹		

Y_1 : دمای تشکیل ژل، Y_2 : نقطه ذوب

با توجه به شرایط آزمایش، دمای تشکیل ژل برای کاراگینان در محدوده ۳۸/۱-۳۰/۱ درجه سانتی‌گراد محاسبه گردید. در صورتی که برای نمونه بومی (بدون پیش‌فرآوری) $28/3 \pm 0/2$ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. بنابراین دمای تشکیل ژل کاراگینان تولید شده با نمونه‌های تیمار یافته، در مقایسه با نمونه بدون پیش‌فرآوری از مقدار بالاتری برخوردار شده است که می‌توان ناشی از شرایط آزمایش به ویژه تیمار قلیایی دانست. اگرچه هم‌زمان متغیرهای ورودی مانند اثر هم‌زمان غلظت قلیا و دما نیز مؤثر می‌باشد. که این نتیجه مشابه مطالعه یاسیتا و همکاران (۲۰۰۹) می‌باشد (۲۱). مطابق با مقالات استاندارد کیفی کاراگینان برای

دمای تشکیل ژل برابر با $34/1 \pm 1/86$ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که محدوده استاندارد در بازه نمونه مورد مطالعه می‌باشد (۲۲ و ۲۳).

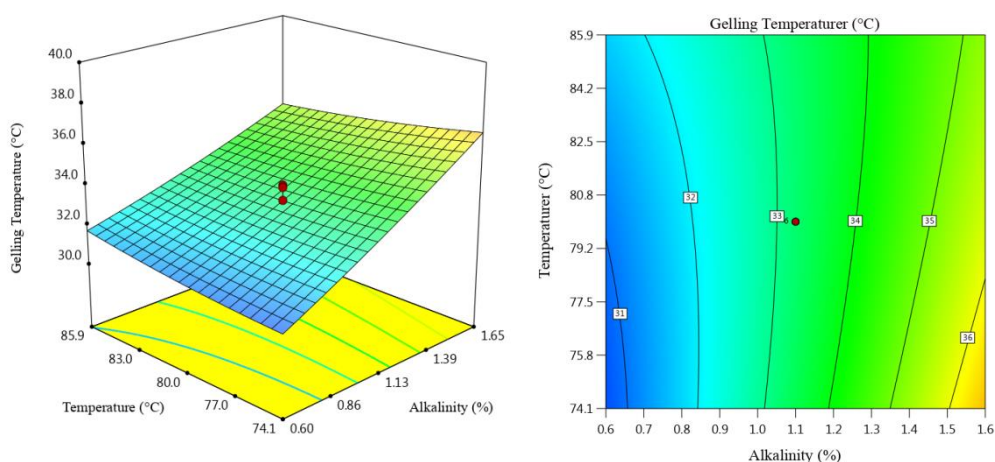
طی پژوهشی (۲۰۰۲) میزان دمای تشکیل ژل کارژینوفیت *Eucheuma cottonii* را در بازه ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش نمودند. یاسیتا (۲۰۰۹) برای همین کارژینوفیت دمای تشکیل ژل را ۲۷-۳۲ درجه سانتی‌گراد اعلام نمود. طی بررسی دیگری در سال ۲۰۱۶ نیز این پارامتر را برای ژل کارژینوفیت *Eucheuma cottonii* برابر با $35/22 - 40/08$ درجه سانتی‌گراد محاسبه نمودند. طی گزارش‌های دمای تشکیل ژل برای کاراگینان *H. bryoides* برابر با

قلیا می‌تواند با وزن مولکولی و توزیع وزن مولکولی در کاراگینان مرتبط باشد که این پارامترها به شدت در خواص ژله‌ای کاراگینان مؤثرند (۲۵ و ۲۸).

دمای بالاتر محلول سود را برای حذف سطح سولفات موجود در جلبک دریایی تسهیل می‌کند. این مطابق با نتایج مطالعه ساری و همکاران (۲۰۱۹) است که طی پژوهشی در آن استدلال می‌نماید نقطه ژل شدن نسبت مستقیم با محتوای ۳.۶- انیدروگالاکتوز و نسبت معکوس با محتوای سولفات دارد. وجود سولفات باعث ایجاد پلیمر به شکل سُل می‌شود، به طوری که نقطه ژل به سختی شکل می‌گیرد (۲۲).

$1/07 \pm 30/25$ سانتی‌گراد و $4/73 \pm 35/65$ سانتی‌گراد گزارش گردید که بازه این پارامتر در این پژوهش‌های مشابه مطالعه پیش رو می‌باشد (۲۴، ۲۶، ۲۷ و ۲۹).

شکل ۱ اثرات هم‌زمان دما و غلظت قلیا را بر دمای تشکیل ژل کاراگینان نشان می‌دهند، به نحوی که در ابتدا هم‌زمان با افزایش تیمار قلیایی و افزایش نسبی دمای استخراج، دمای تشکیل ژل نیز افزایش می‌یابد. و در ادامه بالاترین دمای ژل در غلظت قلیای بالا حاصل می‌شود. بر اساس گراف در این هم‌زمانی اثر قلیا نقش مؤثرتری را ایفا می‌کند. در واقع تغییر در دمای ژله‌ای به دلیل پیش‌فرآوری با غلظت‌های متفاوت



شکل ۱- اثرات هم‌زمان غلظت قلیا و دمای استخراج بر دمای تشکیل ژل کاراگینان.

مثبت بیش‌تری را بر تعیین نقطه ذوب کاراگینان داشته است، به نحوی که با افزایش غلظت قلیا، نقطه ذوب نیز افزایش یافت. پس از احراز شایستگی مدل پیشنهادی (جدول ۴)، بر اساس تجزیه و تحلیل رگرسیونی معادله ریاضی پیوستگی نیز به دست آمد (جدول ۵).

اثر شرایط مختلف استخراج بر نقطه ذوب کاراگینان: بر اساس نتایج جدول آنالیز آماری ۳ از بین مؤلفه‌های خطی، هم‌زمان و مجذور، تمامی پارامترها به جز اثر هم‌زمان دما و زمان استخراج (BC) تأثیر معناداری بر نقطه ذوب کاراگینان داشتند ($P < 0/05$). بر اساس F -value قلیایی بودن نیز تأثیر

جدول ۴- آنالیز آماری فاکتورهای دخیل در مدل پاسخ‌ها.

خطای استاندارد	p-value	F-value	درجه آزادی	ضریب برآورد	فاکتور	
۰/۱۹	۰/۰۰۰۱>	۱۵۱/۹۵	۱	۲/۳۷	A	
۰/۱۹	۰/۶۳۸۸	۰/۲۳	۱	-۰/۰۹۳	B	
۰/۱۹	۰/۱۹۹۷	۱/۸۹	۱	۰/۲۶	C	
۰/۲۵	۰/۰۳۹۱	۵/۶۳	۱	-۰/۰۶	AB	
۰/۲۵	۰/۸۸۴۱	۰/۰۲۲	۱	-۰/۳۸	AC	Y ₁
۰/۲۵	۰/۵۲۵۴	۰/۴۳	۱	-۰/۱۷	BC	
۰/۱۹	۰/۳۵۸۱	۰/۹۳	۱	۰/۱۸	A ²	
۰/۱۹	۰/۴۲۰۴	۰/۷۱	۱	۰/۱۶	B ²	
۰/۱۹	۰/۰۱۳۰	۹/۱۰	۱	۰/۵۶	C ²	
۰/۲۷	۰/۰۰۰۱>	۲۹۶/۰۶	۱	۴/۷۳	A	
۰/۲۷	۰/۰۱۸۹	۷/۸۲	۱	۰/۷۷	B	
۰/۲۷	۰/۰۱۹۶	۷/۷۰	۱	۰/۷۶	C	
۰/۳۶	۰/۰۰۰۵	۲۵/۲۳	۱	-۱/۸	AB	
۰/۳۶	۰/۰۰۰۵	۲۶/۰۷	۱	-۱/۸۳	AC	Y ₂
۰/۳۶	۰/۲۱۷۳	۱/۷۳	۱	۰/۴۷	BC	
۰/۲۷	۰/۰۰۰۵	۲۴/۹۹	۱	۱/۳۴	A ²	
۰/۲۷	۰/۰۰۰۵	۲۴/۸۶	۱	۱/۳۳	B ²	
۰/۲۷	۰/۰۰۰۱>	۱۱۹/۹۰	۱	۲/۹۳	C ²	

Y₁: دمای تشکیل ژل، Y₂: نقطه ذوب، A: غلظت قلیا (درصد)، B: دمای استخراج (درجه سانتی‌گراد)، C: زمان استخراج (دقیقه)

جدول ۵- مدل رگرسیونی و ضرایب مقادیر R.

پاسخ	مدل	R ²	R-Adj	R-Pred
Y ₁	$33/2 + 23/37A - 0/093B + 0/26C - 0/6AB - 0/38AC - 0/17BC + 0/18A^2 + 0/16B^2 + 0/56C^2$	۰/۹۴۴۴	۰/۸۹۴۴	۰/۷۷۰۴
Y ₂	$53/4 + 50/73A + 0/77B + 0/76C - 1/88AB - 1/83AC + 0/47BC + 1/34A^2 + 1/33B^2 + 2/93C^2$	۰/۹۸۰۹	۰/۹۶۳۷	۰/۸۵۹۰

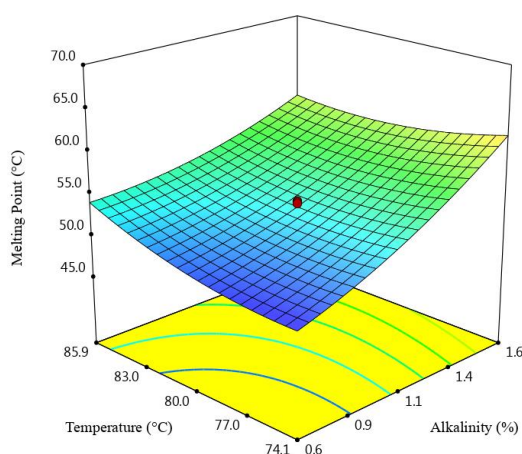
Y₁: دمای تشکیل ژل، Y₂: نقطه ذوب

یافت و در محدوده ۱۲/۲-۴۹/۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشت. افزایش نقطه ذوب کاراگینان تیمار شده می‌تواند صرف‌نظر از متغیرهای ورودی و شرایط استخراج ناشی از وقوع متیلاسیون باشد (۲۵).

با انجام طرح آزمایش‌ها، میزان نقطه ذوب کاراگینان از نمونه بومی (بدون پیش‌فرآوری) ۳۹/۲±۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد، اما با وجود پیش‌فرآوری نقطه ذوب کاراگینان بسیار افزایش

شرایط استخراج و نوع نمونه می باشد که البته با توجه به نتایج موجود، خروجی های این پژوهش نیز در همین محدوده ها می باشد.

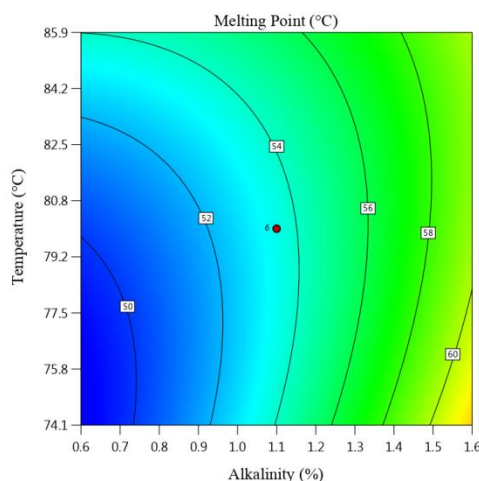
شکل ۲ نشان دهنده اثر همزمان متغیرهای غلظت قلیا و دما بر دمای تشکیل ژل را نشان می دهد، به گونه ای که یک رابطه مثبت بین این دو متغیر مفروض می شود، یعنی با افزایش همزمان آن ها دمای تشکیل ژل نیز افزایش می یابد. با توجه به شیب نمودار، اثرگذاری غلظت قلیا نسبت به دما بیش تر می باشد. که این مطالعه مشابه مطالعه یاسیتا و همکاران (۲۰۰۹) می باشد (۲۱).



شکل ۲- اثرات همزمان غلظت قلیا و دما بر نقطه ذوب کاراگینان.

است. در واقع همزمان با افزایش تیمار قلیایی و زمان استخراج، کاراگینان استحصالی در دماهای بالاتر ذوب می گردد و رابطه مثبت بین این دو متغیر ایجاد می گردد. با توجه به شیب گراف نیز می توان دریافت در این همزمانی، تأثیر زمان استخراج بیش تر می باشد. این رویداد را می توان ناشی از افزایش وزن مولکولی و همچنین وقوع بیش تر متیلاسیون در این محدوده دانست چرا که هرچه میزان وزن مولکولی بالاتر باشد، احتمال تشکیل تعاملات پایدارتر درون توالی ژلی

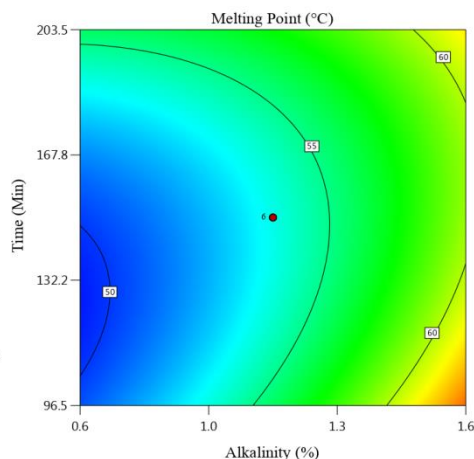
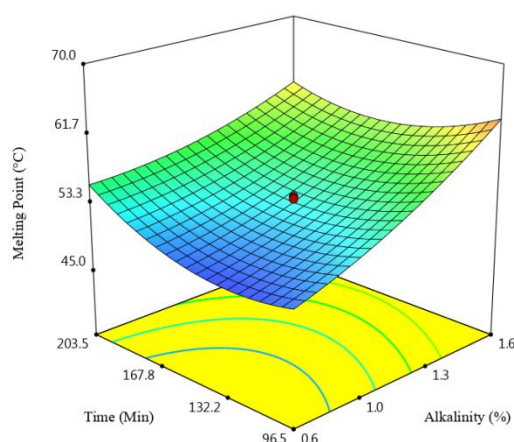
مطابق با پژوهش های نمایه شده سال ۲۰۱۹ استاندارد نقطه ذوب کاراگینان صنعتی برابر با 50.21 ± 1.05 درجه سانتی گراد می باشد (۲۴). نقطه ذوب کاراگینان این گونه نیز با کسب این استاندارد، نمایانگر کاربردهای ممکن آن در صنعت می باشد. محدوده نقطه ذوب کاراگینان *Eucheuma cottonii* در سال ۲۰۰۹ برابر با $46-49.5$ درجه سانتی گراد و طی مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ نیز برابر با $24.38-35.35$ درجه سانتی گراد گزارش گردید. با توجه به نتایج به دست آمده دمای ذوب برای کاراگینان *H. bryoides* در محدوده 1.07 ± 30.25 سانتی گراد و 4.73 ± 35.65 سانتی گراد ارائه شدند (۲۶ و ۲۷). این تفاوت ها بیانگر



به طور کلی، پیش فراوری قلیایی اساساً برای بهبود خواص ژله ای از طریق کاهش گروه های سولفات در ساختار انجام می شود. با این حال، اگر به درستی انجام نشود، همین فرآیند ممکن است بر ویژگی های کیفی تأثیر منفی بگذارد که این اثر منفی مربوط به تخریب پلی ساکارید پس از پیش فراوری قلیایی است که با کاهش شدید وزن مولکولی همراه می شود (۲۲ و ۳۱). برهم کنش مثبت میان غلظت قلیا و زمان استخراج بر نقطه ذوب کاراگینان در شکل ۳ مشخص شده

طبیعی قادر به افزایش دمای تشکیل ژل و همچنین نقطه ذوب بیوپلیمرهای دریایی می‌شود (۳۲).

بیش‌تر می‌باشد که نتیجتاً منجر به افزایش نقطه ذوب می‌گردد. بعضاً جانشینی و تعویض گروه‌های متیل استر بر خواص ژلی مؤثر هستند، چرا که متیلاسیون



شکل ۳- اثرات هم‌زمان غلظت قلیا و زمان بر نقطه ذوب کاراگینان.

مطلوبیت ۸۰ درصد پیشنهاد شد. مقادیر واقعی و پیش‌بینی مدل و نتایج حاصل از مقایسه میانگین آن‌ها در جدول ۶ نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری بین مقادیر واقعی با پیشنهادی مدل در مورد هیچ پارامتری وجود نداشت و نشان‌دهنده از مطابقت مدل با مقادیر واقعی بود چرا که مقدار معنی‌داری مشاهده شده از عدد (۰/۰۵) بزرگ‌تر شده است. (جدول ۶).

انتخاب تیمار بهینه و تست مطلوبیت: به منظور انتخاب تیمار بهینه از بهینه سازی عددی استفاده شد. تنظیمات اعمال شده در این روش شامل بیشینه متغیر غلظت قلیا با درجه اهمیت ۵ بوده و برای سایر متغیرها نیز در همان محدوده آزمایش تعریف شدند. در پایان غلظت قلیا، دما و زمان استخراج به ترتیب ۱/۵۳ درصد، ۸۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۳ دقیقه با

جدول ۶- مقایسه نتایج پیش‌بینی مدل و مقادیر واقعی.

p-value	مقادیر واقعی	پیش‌بینی مدل	پاسخ
۰/۱۰۴	۳۷/۲۹±۰/۶۲	۳۵/۴	دمای تشکیل ژل
۰/۱۵۱	۶۳/۸۱±۰/۹۱	۶۱/۴	نقطه ذوب ژل

میانگین ± اشتباه معیار (n=۳)

ذوب و تشکیل ژل به دست آمده برای این بیوپلیمر نیز در محدوده استانداردهای کیفی و صنعتی می‌باشند. بنابراین با توجه به نتایج حاصل و ارزیابی سایر پارامترها این کارژینوفیت پتانسیل معرفی به صنایع مختلف جهت استخراج کاراگینان را دارد.

در واقع انطباق نتایج بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار با نتایج آزمایشگاهی، نشان‌دهنده مدلسازی مطلوب با روش سطح پاسخ در استخراج بهینه کاراگینان می‌باشد. پارامترهای مؤثر در فرآیند تیمار بهینه مشخص گردید. ضمن این‌که محدوده نقاط

سیاسگزاری

۹۵۸۳۷۷۸۵) انجام گرفته است؛ بدین وسیله از مساعدت ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی و با استفاده از اعتبارات و حمایت های مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (به شماره طرح

منابع

- Venkatesan, J., Anil, S., & Se-Kwon Kim. (2017). Seaweed Polysaccharides, Isolation, Biological and Biomedical Applications.
- Dhewang, B., Yudiati, E., & Alghazeer, R. (2023). Carrageenan Extraction of *Kappaphycus alvarezii* Seaweed from Nusa Lembongan Waters Using Different Alkaline Treatments. *Journal Kelautan Tropis*, 26 (2), 238-244.
- Chevenier, A., Jouanneau, D., & Ficko-Blean, E. (2023). Carrageenan biosynthesis in red algae: A review. *The Cell Surface*. 100097-100102.
- Rupert, R., Rodrigues, K., Thien, V., & Yong, W. (2022). Carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae): Metabolism, Structure, Production, and Application. *Frontiers in Plant Science*.
- Allison, G., & O'leary, N. (2016). Carrageenan gel air freshener: Google Patents.
- Esmaili, C., Heng, L. Y., Chiang, C. P., Rashid, Z. A., Safitri, E., & Marugan, R. S. P. M. (2017). A DNA biosensor based on kappa-carrageenan-polypyrrole-gold nanoparticles composite for gender determination of Arowana fish (*Scleropages formosus*). *Sensors Actuat: B Chemical journal*. 242, 616-624.
- Ooi, L., Heng, L., Y., & Mori, I. C. (2015). A high-throughput oxidative stress biosensor based on *Escherichia coli* roGFP2 cells immobilized in a k-carrageenan matrix. *Sensors*. 15 (2), 2354-2368.
- Zhou, G., Sheng, W., Yao, W., & Wang, C. (2006). Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. *Pharmacological Research*. 53, 129-134.
- Caceres, P. J., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Matsuhira, B., & Zuniga, E. A. (2000). Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity. *Phytochemistry*. 53, 81-86.
- Rajasulochana, P., & Preethy, V. (2015). Biotechnological applications of marine red algae. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 7(12), 477-481.
- Rhein-Knudsen, N. A., Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2015). Seaweed hydrocolloid production: An update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Marine Drugs*. DOI 10.3390/md13063340.
- Hayashi, L., Oliveira, E. C., Bleicher-Lhonneur, G., Boulenguer, P., Pereira, R. T. L., Seckendorff, R. V., Shimoda, V. T., Leflamand, A., Vallée, P., & Critchley, A. T. (2007). The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Journal of Applied Phycology*. 19, 505-511.
- Bixler, H. J., & Porse, H. (2011). A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology*. 23, 321-335.
- Youssef, L., Lallemand, L., Giraud, P., Soulé, F., Bhaw-Luximon, A., Meilhac, O., D'Hellencourt C. L., Jhurry, D., & Couprie, J. (2017). Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. *Carbohydrate Polymers*. 166, 55-63.
- Rafiqzaman, S. M., Ahmed, R., Lee, J. M., Noh, G., Jo, G., & Kong, S. (2015). Improved methods for isolation of carrageenan from *Hypnea musciformis* and its antioxidant activity. *Journal of Applied Phycology*.
- Azevedo, G., Torres, D., Sousa-Pinto,

- L., & Hilliou, L. (2015). Effect of pre-extraction alkali treatment on the chemical structure and gelling properties of extracted hybrid carrageenan from *Chondrus crispus* and *Ahnfeltiopsis devoniensis*. *Food Hydrocolloids*. 50, 150-158.
17. Webber, V., Carvalho, S. M., Ogliari, P. J., Hayashi, L., & Barreto, P. L. M. (2012). Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 32 (4), 812-818.
18. Mendoza, W. G., Ganzon-Fortes, E. T., Villanueva, R. V., Romero, R. V., & Montañó, M. N. E. (2006). Tissue age as a factor affecting carrageenan quantity and quality in farmed *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva. *Botanica Marina*. 49, 57-64.
19. 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.
20. Sousa, A. M. 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. *Journal of Bioresource Technology*. 101, 3258-3267.
21. Yasita, D., & Rachmawati, I. D. (2009). [Optimization of Extraction Process in Making Carrageenan from Seaweed *Euclima cottonii* to Achieve Food Grade. <http://eprints.undip.ac.id/3333/>. Diakses 11 Maret.
22. Sari, K. D., Barleany, D., Lestari, R. S. D., & Mustikawat, L. (2010). Extraction refined carrageenan using ultrasonic irradiation in from *Kappaphycus Alvarezii* originated from Lontar. *Materials Science and Engineering*, 673-681. DOI:10.1088/1757-899X/673/1/012015.
23. Chairani, L. (2019). The Alkali Concentration Effect on Quality of Semi Refined Carrageenan Production: A Meta-Analysis. Laela, Proceedings of the International Conference on Industrial Engineering and Operations Management Pilsen, Czech Republic, July 23-26.
24. Widiastuti, H. N. (2019). Effect of NaOH Concentration on Caragenan (*Euclima cottonii*) from Karimun Jawa and Madura, *Agritech*. 24 (4), 204-209.
25. Kumar, V., & Fotedar, R. (2009). Carrageenan extraction process for *Hypnea cliftonii* (Withell, Millar, & Kraft, 1994). *Carbohydr. Polym.* 78, 813-819.
26. La Ega, Lopulalan, Cynthia G. C., & Meiyasa, F. (2016). Study of Seaweed (*Euclima cottonii*) Carrageenan Quality based on Physicochemical Properties by Extraction using Different Potassium Hydroxide (KOH), *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 5 (2), 38-44.
27. Al-Alawi, A., Al-Marhubi, A. A., Al-Belushi, I. M., & Bassam, M. S. M. (2011). Characterization of Carrageenan Extracted from *Hypnea bryoides* in Oman. *Marine Biotechnology*. 5, 893-899.
28. Freile-Peigrín, Y., & Murano, E. (2005). Carrageenans from three species of *Hypnea* (Rhodophyta) from Yucatan Peninsula. *Bioresour. Technol.* 96, 295-302.
29. Sahu, N., Meena, R., & Ganesan, M. (2011). Effect of grafting on the properties of kappa-carrageenan of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva. *Carbohydrate Polymers*. 84, 584-592.
30. Zainab Mohammed Al-Nahdi, Z. M., Al-Alawi, A., & Al-Marhobi, I. (2019). The Effect of Extraction Conditions on Chemical and Thermal Characteristics of Kappa-Carrageenan extracted from *Hypnea bryoides*. *Journal of Marine Biology*. DOI:10.1155/2019/5183261.
31. Rodríguez, M. C., Matulewicz, M. C., Nosedá, M. D., Ducatti, D. R. B., & Leonardi, P. L. (2009). Carrageenan from *Hypnea gracilis* (Hypneales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and

physical properties. *Bioresour. Technol.* 100, 1435-1441.
32. Falshaw, R., Furneaux, R. H., & Stevenson, D. E. (1998). Carrageenans

from nine species of red seaweed in the genus *Curdia* (Hypneaceae, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* 308, 107-115.