

بهینه سازی شرایط استخراج آلزینات سدیم از جلبک قهوه‌ای ایرانی (*Nizimuddinia zanardini*) به روش سطح پاسخ

رویا ابکا خواجهی^{۱*}، جواد کرامت^۲ و ناصر همدی^۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

^۱ دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

^۲ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

*مسئول مکاتبه: Email: r_abka@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: آلزینیک اسید و آلزینات‌ها مصارف مهمی در صنایع غذایی، پزشکی، داروسازی، دندانپزشکی و نساجی دارند. **هدف:** هدف از این پژوهش بهینه سازی شرایط استخراج آلزینات سدیم از دیواره سلولی جلبک قهوه‌ای ایرانی (*Nizimuddinia zanardini*) می باشد. **روش کار:** از آنجائیکه جلبک‌های قهوه‌ای دریای جنوب ایران (منطقه چابهار) دارای این پلیمر طبیعی اند، استخراج آلزینات سدیم در سه مرحله و با استفاده از محلول‌های اسیدی و قلیایی و به دنبال آن رسوب آلزینات سدیم توسط اتانول با استفاده از روش سطح پاسخ (*RSM*) بهینه سازی شد. برای بهینه سازی شرایط، در مرحله اسیدی تأثیر فاکتورهای درجه حرارت استخراج با اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در دامنۀ °C ۶۰-۲۵ و زمان استخراج در محدوده ۰/۵ تا ۳/۵ ساعت بر متغیرهای وابسته شامل درصد بازده استخراج، میزان پلی فنل‌ها و مقدار پروتئین‌های آلزینات استخراج شده مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و پس از بهینه سازی این فاکتورها در مرحله قلیایی، درجه حرارت استخراج با کربنات سدیم در بازه °C ۶۰-۹۰، زمان استخراج در محدوده ۲-۴ ساعت و غلظت محلول در محدوده ۲ % - ۴ (وزنی/حجمی) به عنوان فاکتورهای مؤثر بر درصد بازده استخراج، مقدار پلی فنل‌ها و ویسکوزیته ظاهری آلزینات استخراج شده، مورد مطالعه قرار گرفت و فاکتورها بهینه سازی شدند. **نتایج:** در مرحله اسیدی هر دو فاکتور درجه حرارت و زمان بر درصد بازده استخراج و کیفیت صمغ استخراجی (خلوص) تأثیر معنی دار دارند و در مرحله قلیایی تمامی فاکتورها بر بازده، کیفیت و ویسکوزیته ظاهری پلیمر استخراجی تأثیر معنی دار دارند. شرایط بهینه استخراج آلزینات سدیم از جلبک قهوه‌ای (*Nizimuddinia zanardini*) به صورت زیر معرفی گردید. در مرحله اسیدی درجه حرارت: °C ۶۰، زمان: ۳ ساعت و در مرحله قلیایی غلظت: ۳ % (وزنی/حجمی)، درجه حرارت: °C ۶۰ و زمان: ۳ ساعت.

واژگان کلیدی: آلزینات سدیم، بهینه سازی استخراج، پلی ساکارید، جلبک قهوه‌ای ایرانی، روش سطح پاسخ

مقدمه

جلبک‌های دریایی یکی از منابع قابل تجدید حیات هستند که از محیط زیست دریایی به دست آمده و قابلیت استفاده درمانی و غذایی دارند و می‌توان آن‌ها را به دو گروه ماکروجلبک‌ها و میکروجلبک‌ها تقسیم‌بندی کرد. ماکروجلبک‌های دریایی گیاهان فتوسنتز کننده‌ای هستند که توده‌های زیستی اولیه در مناطق بین جزر و مدی می‌باشند (کومار و همکاران ۲۰۱۱). جلبک دریایی غنی از پلی ساکاریدها و منبع بسیار خوبی از ترکیبات فعال زیستی مانند کاروتنوئید، فیبرهای غذایی، پروتئین، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب ضروری و مواد معدنی می‌باشند (چاندینی و همکاران ۲۰۰۸؛ ویلاریل-گومز و همکاران ۲۰۱۰). حدود ۹۰۰۰ گونه ماکروجلبک دریایی وجود دارد که به طور گسترده‌ای به سه گروه عمده ی، جلبک‌های قهوه‌ای، قرمز و سبز بر اساس رنگدانه طبقه بندی می‌شوند که هر کدام از آن‌ها دارای یک نوع پلی ساکارید می‌باشند، به طوری که آلژینات فراوانترین آن‌ها در جلبک دریایی قهوه ای است و گاهی بیشتر از ۴۰٪ وزن خشک جلبک قهوه‌ای را تشکیل می‌دهد. این پلی ساکاریدها از هر دو منابع گیاهی و باکتریایی به دست می‌آیند (پرسیوال و مک‌دول ۱۹۹۰؛ میاشیتا و همکاران ۲۰۱۳؛ تورز و همکاران ۲۰۰۷). استفاده از هیدروکلوئیدهایی مانند گوار، آلژینات، کاراگینان، گزانتان، پکتین و انواع دیگر صمغها در مواد غذایی مختلف و به‌ویژه نوشیدنیها به منظور افزایش گرانروی یا بدست آوردن پایداری و احساس دهانی مطلوب متداول است (شمسی و همکاران ۱۳۹۷). آلژینات‌ها در دیواره سلولی به عنوان مخلوطی از کلسیم، پتاسیم و سدیم اسید آلژینیک وجود دارند که در آن واحدهای بتا دی مانورونیک اسید (M) با پیوندهای ۱ به ۴ به واحدهای آلفا ال گلورونیک اسید (G) متصل شده است (پاوار و ادگار ۲۰۱۲؛ دسوسا و همکاران ۲۰۰۷). ترکیب شیمیایی، تعداد و توالی واحدهای M و G به نوع گونه، سن جلبک، فصل رشد، منبع بیولوژیکی و شرایط رشد جلبک بستگی دارد (دیویس و همکاران ۲۰۰۳؛ کاراکی و همکاران ۲۰۱۳).

این پلی ساکاریدها دارای سه نوع توالی MM، GG و MG هستند و خواص فیزیکی آلژینات‌ها به نسبت این سه نوع توالی بستگی دارد (هاگ و لارسن ۱۹۶۲). به طور مثال، یکی از ویژگی‌های مشخص آلژینات سدیم توانایی تشکیل ژل در حضور کاتیون‌های چند قطبی مانند Ca^{+2} است و توانایی تشکیل ژل از آلژینات، با اضافه کردن یون‌های کلسیم، مربوط به توالی‌های GG می‌باشد. با افزودن یون Ca^{+2} یک پل ارتباطی محکم بین این کاتیون‌ها و گروه‌های کربوکسیل از زنجیره‌های مختلف در توالی GG تشکیل می‌شود و شبکه سه بعدی ژل مانند را بوجود می‌آورد. این شبکه نامحلول در آب بوده و غیرقابل برگشت حرارتی است، بنابراین نسبت بالای توالی‌های GG منجر به افزایش قدرت ژل می‌شود، در حالی که نسبت پایین‌تر از آن‌ها باعث تولید ژل الاستیک‌تر می‌شود که به مقادیر بالای کلسیم نسبتاً پایدار است (دراگت و تیلور ۲۰۱۱؛ پنمان و ساندرسون ۱۹۷۲). آلژینات سدیم یک پلیمر محلول در آب است که محلول‌های بسیار ویسکوزی ایجاد می‌کند و می‌توان آن را به عنوان یک استابیلایزر، تثبیت کننده و قوام دهنده در صنایع مختلف خصوصاً صنایع غذایی استفاده کرد (سیم و یلما ۱۹۹۰). آلژینات به طور گسترده‌ای در بسیاری از زمینه‌ها مانند بی حرکت سازی سلول، مهندسی بافت، میکروکپسوله کردن مواد پاک کننده و مواد دارویی و همچنین به عنوان پوشش و فیلم خوراکی برای محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (ونوگوپال ۲۰۱۱؛ یانگ و همکاران ۲۰۱۱).

هدف از این پژوهش بهینه سازی شرایط استخراج آلژینات سدیم از جلبک قهوه‌ای سواحل دریای جنوب ایران (*Nizamuddinina zanardini*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جلبک قهوه‌ای *Nizamuddinina zanardini* از مناطق بین جزر و مدی سواحل چابهار در دی ماه سال ۱۳۹۴ جمع آوری و با اطلس جلبک‌های دریایی سواحل خلیج فارس و

پروتئین در آلزینات استخراج شده و ویسکوزیته محلول ۱ درصد (وزنی/حجمی) آلزینات به عنوان متغیرهای وابسته در آزمون سطح پاسخ انتخاب شدند. در گام اول پارامترهای مرحله اسیدی، بهینه شد و در گام دوم با ثابت نگه داشتن شرایط اسیدی بهینه شده، پارامترهای مرحله قلیایی بهینه سازی شدند. در هرگام از طرح D-optimal استفاده گردید.

درصد استخراج آلزینات

درصد بازده استخراج آلزینات سدیم بر اساس وزن جلبک اولیه محاسبه گردید.

اندازه گیری مقدار کل پروتئین

مقدار ازت آلی با استفاده از روش تغییر یافته کلدال اندازه گیری شد. (پایوا و همکاران ۲۰۱۴؛ لورنکو و همکاران ۲۰۰۲).

اندازه گیری مقدار کل فنل ها

مقدار کل ترکیبات فنلی در آلزینات های استخراج شده توسط روش سینگلتن و رزی (۱۹۶۵) اندازه گیری شد.

اندازه گیری ویسکوزیته

ویسکوزیته ظاهری آلزینات استخراج شده در غلظت ۱٪ (وزنی/حجمی) و در دمای محیط با اسپیندل شماره ۲۱ و با دستگاه ویسکومتر بروکفیلد در ۶۰ rpm اندازه گیری شد.

نتایج

در روش سطح پاسخ برای هر متغیر وابسته (پاسخ) مدلی تعریف می شود که اثر فاکتورها را بر روی آن متغیر به طور جداگانه بیان می نماید مدل چند متغیره به صورت زیر می باشد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^r \beta_i X_i + \sum_{i=1}^r \beta_{ii} X_i X_i + \sum_{i=1}^r \beta_{ij} X_i X_j$$

در مدل فوق β_0 عرض از مبدا، β_i ضریب رگرسیون خطی فاکتور i ام، β_{ii} ضریب رگرسیون درجه دوم فاکتور i ام، β_{ij} اثر متقابل فاکتور i ام و فاکتور j ام و γ متغیر وابسته یا همان پاسخ می باشد.

دریای عمان شناسایی گردید. پس از شستن با آب لوله کشی و سپس با آب مقطر به منظور حذف ذرات ماسه چسبیده به آن و ناخالصی ها، خشک کردن در آفتاب و سرانجام آسیاب کردن نمونه خشک شده انجام شد.

استخراج و خالص سازی آلزینات

مراحل استخراج و خالص سازی آلزینات سدیم بر اساس روش کالومپنگ و همکاران (۱۹۹۹) به صورت زیر می باشد. در ابتدا ۲۵ گرم پودر جلبک خشک شده با ۸۰۰ میلی لیتر فرمالدئید ۲٪ (حجمی/حجمی) به مدت ۲۴ ساعت و در دمای اتاق تحت هم زدن ۲۵۰ rpm قرار می گیرد تا چربی ها و ترکیبات فنلی حذف شوند. پس از این مدت و حذف کامل فرمالدئید و شستشو با آب مقطر، نمونه ها با اسیدکلریدریک ۰/۲ مولار در دمای اتاق و به مدت ۲۴ ساعت تحت هم زدن ۲۵۰ rpm تیمار می شوند تا آلزینات موجود در جلبک به صورت اسید آلزینیک نامحلول درآید. محلول روئی توسط سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه و rpm ۱۰۰۰۰ حذف شده و باقیمانده با آب مقطر شسته می شود. رسوبات با ۸۰۰ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۲٪ (وزنی/حجمی) در ۱۰۰°C به طور مکانیکی و به مدت ۳ h هم زده شده تا اسید آلزینیک به فرم آلزینات سدیم درآید. بوسیله سانتریفیوژ (۳۰ min، ۱۰۰۰۰ g) محلول روئی جهت خالص سازی آلزینات سدیم جمع آوری گردیده و سه برابر حجم این محلول، اتانول خالص اضافه می شود. رسوبات حاصل توسط فیلتر جمع آوری شده و به منظور خالص سازی بیشتر، رسوبات در آب مقطر حل شده و مجدداً با سه برابر حجم آن، اتانول خالص رسوب داده می شود. رسوبات با فیلتر جمع آوری گردیده و به روش خشک کردن انجمادی خشک می شوند.

طراحی آزمایش

در این پژوهش، به منظور بهینه سازی شرایط استخراج آلزینات سدیم، دو فاکتور دما و زمان استخراج توسط اسید کلریدریک ۰/۲ مولار و سه فاکتور دما، غلظت و زمان استخراج توسط محلول کربنات سدیم به عنوان فاکتورها و درصد استخراج آلزینات، درصد پلی فنل و درصد

میزان راندمان استخراج آلژینات، مقدار درصد پروتئین و مقدار درصد پلی فنل همراه آلژینات انجام شد. جدول ۱ شرایط مختلف استخراج و نتایج به دست آمده از آزمایشات انجام شده به عنوان متغیرهای وابسته را نشان می‌دهد.

دامنه تغییرات فاکتورهای مرحله اسیدی (اسید کلریدریک) برای دما °C ۶۰-۲۵ و برای زمان ۳/۵-۰/۵ h انتخاب گردید و پس از تجزیه آماری با نرم افزار، ۱۲ روش استخراج با شرایط مختلف دمائی و زمان به دست آمد. آلژینات سدیم با این ۱۲ روش استخراج گردید و بر روی آلژینات‌های استخراج شده، آزمایش‌های اندازه گیری

جدول ۱- مقادیر سطوح فاکتورها و نتایج حاصل از آزمایش‌ها بر روی آلژینات‌های استخراجی

Table 1- Values of factor levels and results of experiments on extracted alginates

sample	Temperature (°C)	code	Time (h)	code	Alginate extraction yield (% w/w)	Proteins (% w/w)	Polyphenols (mg/g)
1	25	-1	0.5	-1	23.62	1.1	0.051
2	60	+1	0.5	-1	26.32	1.1	0.049
3	42.5	0	3.5	+1	24.3	0.55	0.029
4	25	-1	0.5	-1	21.96	0.91	0.05
5	25	-1	3.5	+1	20.02	0.92	0.035
6	32.75	+0.5	2.75	+0.5	24.99	0.82	0.032
7	60	+1	2	0	32.44	0.92	0.041
8	60	+1	3.5	+1	31.78	0.91	0.043
9	25	-1	2	0	24.55	1.1	0.056
10	60	+1	0.5	-1	26.63	1.27	0.041
11	42.5	0	1.25	-0.5	26.07	0.73	0.037
12	60	+1	3.5	+1	30.8	0.73	0.039

گرفته می‌شوند و ضرایب این فاکتورها در حالتی که به صورت معادله درجه دوم اثر گذار باشند β_1^2 و β_2^2 بوده و چنانچه این فاکتورها بر یکدیگر اثر متقابل داشته باشند از ضریب β_{12} استفاده می‌شود.

درمدل‌های ارائه شده، نقص انطباق هیچ کدام از متغیرهای پاسخ، معنی دار نشد. معنی دار شدن نقص انطباق نشان دهنده عدم کفایت یک مدل در مطابقت دادن پارامترهای مورد آزمایش با متغیرهای پاسخ است.

اثر شرایط اسیدی بر درصد راندمان استخراج آلژینات همانطور که از ضرایب مربوط به راندمان استخراج مشاهده می‌شود، هر دو فاکتور دما و زمان، بر درصد راندمان استخراج اثر معنی داری دارند و تأثیر دما بر درصد راندمان استخراج نسبت به تأثیر زمان بیشتر می‌باشد. بین هر دو متغیر دما و زمان نیز (β_{12}) در سطح ۱ درصد اثر متقابل معنی دار وجود دارد. به عبارت دیگر،

حضور پروتئین و پلی فنل‌ها همراه با آلژینات یک امر منفی در فرآیند استخراج محسوب می‌شود، بنابراین در نرم افزار باید محدوده‌ای را تعیین نمود که علاوه بر بالا بودن راندمان استخراج، درصد ناخالصی آن یعنی مقدار پروتئین و پلی فنل همراه آلژینات پائین باشد.

مطابق با تجزیه و تحلیل انجام شده بهترین مدل برای بهینه سازی اثر تمام متغیرها بر پاسخ‌های مورد بررسی، مدل درجه دوم بود. مقادیر ضرایب مدل رگرسیون برازش شده برای صفات مورد مطالعه، مقدار P ، مقدار F و نقص انطباق^۱ در جدول شماره ۲ آمده است. به کمک این ضرایب اثر شرایط استخراج بر روی متغیرهای وابسته تعیین می‌شود.

بر اساس این جدول β_0 عدد ثابت بوده و β_1 و β_2 به ترتیب ضرایب فاکتورهای دما و زمان وقتی که اثر آن‌ها بر متغیرهای وابسته به صورت معادله درجه یک باشد، در نظر

²-Lack of fit

¹-Probability

زمانی که فرایند استخراج در یک طرح سطح پاسخ مورد بررسی قرار می گیرد، نه تنها اثر تک تک عوامل بلکه اثر برهمکنش آن ها حائز اهمیت است. دمای استخراج بر درصد راندمان استخراج آلزینات اثر فزاینده داشت. با افزایش دمای استخراج با اسید کلریدریک، میزان درصد راندمان استخراج با یک شیب صعودی افزایش می یابد. اسید کلریدریک باعث شکستن

دیواره سلولی و آزاد شدن آلزینات می گردد و همچنین نمک های آلزینات موجود در دیواره سلولی را به صورت اسید آلزینیک تبدیل می کند. افزایش دما باعث شکسته شدن بیشتر دیواره سلولی شده و راندمان استخراج آلزینات افزایش می یابد. این نتیجه با مشاهدات کویی و همکاران (۱۹۹۴) مطابقت دارد.

جدول ۲- مقادیر ضرایب برآورد شده مدل انتخابی برای صفات مورد مطالعه و نتایج تجزیه واریانس

Table2-The assessed coefficients contents of the selected model for the studied attributes and the results of the analysis of variance

Extraction yield					Proteins				Polyphenols			
	coefficients	Mean squares	F	P value	coefficients	Mean squares	F	P value	Coefficients	Mean squares	F	P value
model	Quadratic	31.94	89.89	<0.0001	Quadratic	0.073	5.99	0.025	Quadratic	5.95×10^{-5}	4.87	0.04
β_0	+27.31	---	---	---	+0.71	---	---	---	+0.035	---	---	---
β_1	+3.76	123.47	347.51	<0.0001	-0.011	0.001	0.081	0.78	-0.001	2×10^{-5}	0.82	0.4
β_2	+0.52	2.14	6.02	<0.0496	-0.1	0.083	6.78	0.04	-0.004	1.57×10^{-4}	6.41	0.04
β_{12}	+1.89	23.6	66.41	0.0002	-0.079	0.041	3.37	0.11	+0.002	4.57×10^{-5}	1.86	0.22
β_1^2	+1.25	2.62	7.37	0.0349	+0.31	0.16	13.3	0.011	+0.012	2.41×10^{-4}	9.82	0.02
β_2^2	-3.43	22.7	63.9	0.0002	-0.037	0.003	0.22	0.65	-0.004	3.11×10^{-5}	1.27	0.3
R ²	0.98	---	---	---	0.83	---	---	---	---	---	---	---
Lack of fit	---	0.07	0.11	0.94ns	---	0.008	0.5	0.07ns	0.80	1.07×10^{-4}	2.64	0.22ns

β_1 and β_2 represent calculated coefficients for extraction temperature and extraction time, respectively

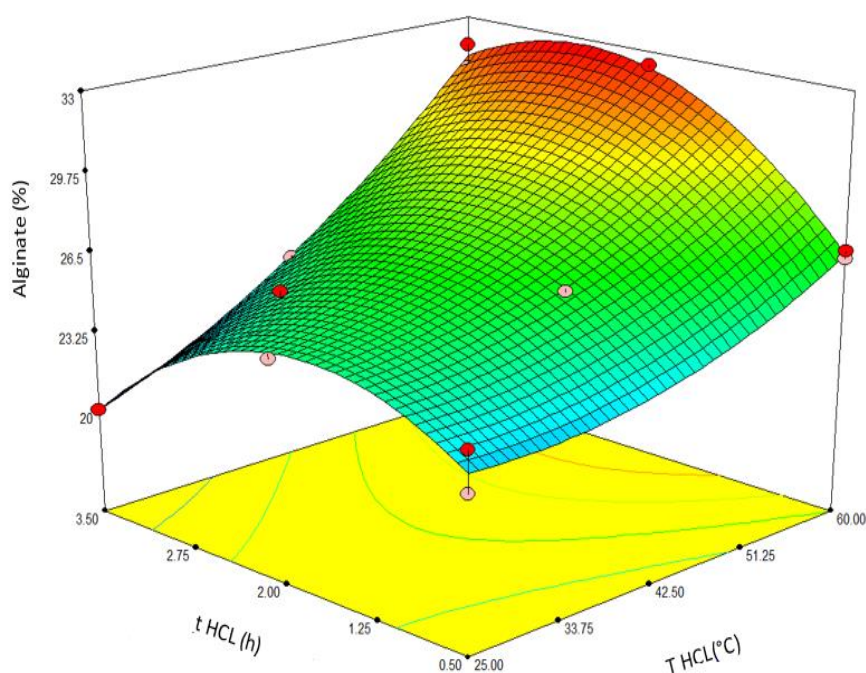
The parameters β_i , β_{ii} and β_{ij} represent the linear, quadratic, and interaction effects of the independent variables.

ns represent a non-significant effect at $P < 0.05$.

با افزایش زمان در یک دمای ثابت ابتدا میزان راندمان استخراج افزایش یافت. این افزایش می تواند به این علت باشد که اسید جهت نفوذ به دیواره سلولی، به زمان نیاز دارد و هرچه زمان افزایش پیدا کند نفوذ پذیری بیشتر شده و دیواره سلولی بیشتر شکسته می شود و در نتیجه راندمان استخراج هم افزایش می یابد اما بعد از آن در اثر تأثیر طولانی مدت اسید و تجزیه پلی ساکارید، راندمان استخراج کاهش می یابد. نتایج حاصله با نتایج کار مازومدر و همکاران (۲۰۱۶) و زیکوینسکا و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد.

شکل ۱ تأثیر هم زمان دما و زمان را بر روی درصد استخراج آلزینات نشان می دهد. افزایش دما موجب افزایش تأثیر فاکتور زمان شد بدین معنی که بر همکنش دما و

زمان بر درصد راندمان استخراج اثر معنی دار افزایشی داشت. در دماهای پائین تأثیر زمان بر راندمان استخراج کم است چرا که شکستن دیواره سلولی کم صورت می گیرد اما در دماهای بالا که عامل حرارت به شکسته شدن دیواره سلولی کمک می کند، تأثیر تغییرات زمان مشهودتر است.



شکل ۱- اثر هم زمان دما و زمان بر درصد راندمان استخراج

Figure 1 - Effect of temperature and time on extraction yields

$$Y = 27.31 + 3.76 X_1 + 0.52 X_2 + 1.89 X_1 * X_2 + 1.25 X_1^2 - 3.43 X_2^2$$

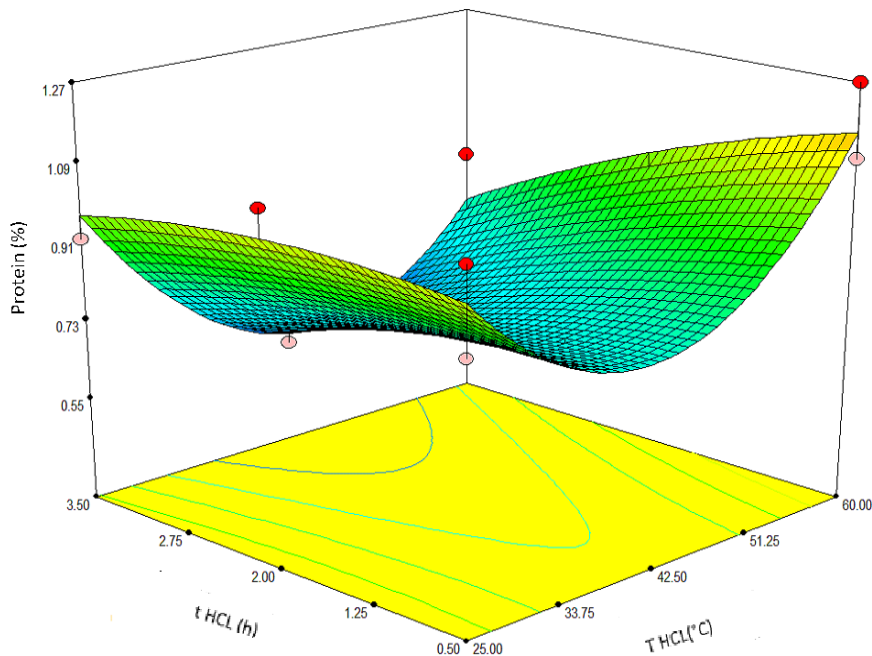
ماهرانی و همکاران (۱۳۸۳) مطابقت دارد. درخصوص پلی فنل‌ها، در ابتدا با افزایش دمای استخراج میزان ترکیبات پلی فنلی همراه آلزینات کاهش یافت چرا که با افزایش دما انتشار ترکیبات پلی فنلی از داخل سلول افزایش می‌یابد و همراه با عصاره از بافت سلول خارج می‌شوند ولیکن در دماهای بالا، پیوندهای فنلی بیشتر و گروه‌های عاملی بیشتری آزاد می‌شوند و تجزیه پلی فنل‌ها نیز اتفاق می‌افتد. نتایج با کار کوماتسو و همکاران (۱۹۹۲) و جی‌هو و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد. با افزایش زمان میزان پلی فنل همراه با آلزینات کاهش می‌یابد. در واقع با افزایش زمان، تجزیه دیواره سلولی بیشتر شده و از طرفی مدت زمان تماس حلال و حل شونده زیاد می‌شود بنابراین پلی فنل بیشتری از درون سلول استخراج شده و همراه با فاز آبی به عنوان ناخالصی از سیستم استخراج حذف می‌شوند و پلی فنل کمتری همراه با بافت و پلی ساکاریدهای دیواره سلولی باقی می‌ماند. نتایج با کار لین و همکاران (۲۰۰۸) و آریان‌فر و همکاران (۱۳۹۴) مطابقت دارد. شکل‌های ۲ و ۳ تأثیر دما و زمان بر روی میزان پروتئین و پلی

اثر شرایط استخراج اسیدی بر میزان پروتئین و پلی

فنل‌های همراه با آلزینات

مقدار پروتئین و پلی فنل همراه با آلزینات به طور معنی داری ($P < 0.05$) تحت تأثیر زمان استخراج قرار داشت. از طرفی مولفه درجه دو دما اثر معنی داری ($P < 0.05$) بر درصد پروتئین و درصد پلی فنل داشت. میزان تأثیر دمای استخراج نسبت به میزان تأثیر زمان بیشتر بود. همچنین بین دو متغیر دما و زمان (β_{12}) اثر متقابل معنی دار وجود ندارد. در خصوص پروتئین‌ها استخراج در دمای بالا و مدت زمان طولانی موجب کاهش مقدار پروتئین همراه آلزینات شد. در واقع مدت زمان زیاد استخراج باعث ایجاد واکنش‌های شیمیایی پروتئین و جدا شدن بخش نامحلول پروتئین شده است از طرفی با افزایش درجه حرارت، استخراج پروتئین آسان‌تر صورت می‌گیرد و این مسئله با توجه به خواص پروتئین‌ها قابل انتظار است. این نتایج با نتایج گزارش شده توسط جوکی و همکاران (۲۰۱۴) در زمینه استخراج موسیلاژ از دانه به و نتایج کار

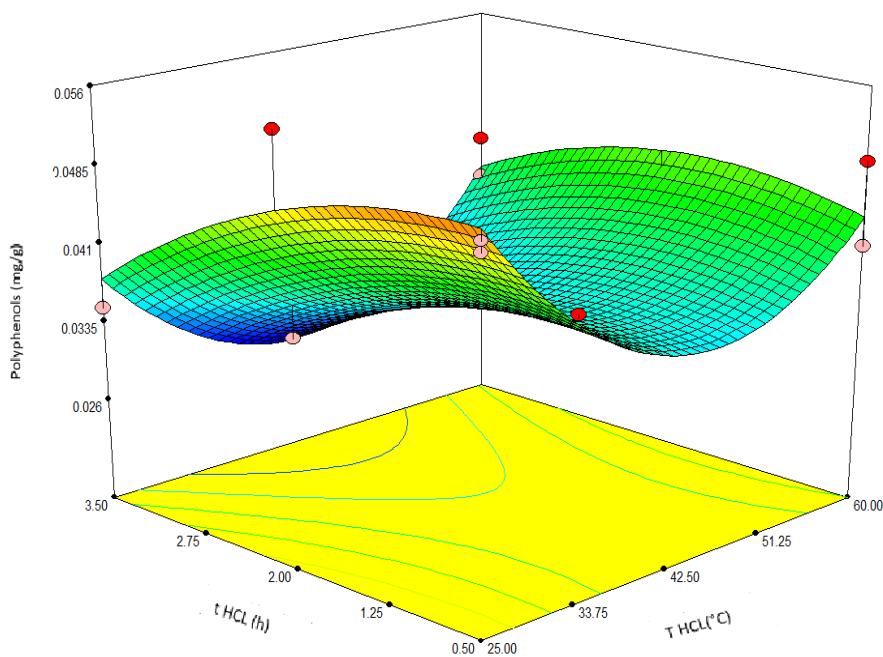
فنل استخراج شده همراه با آلژینات را به صورت سه بعدی و با خطوط کانتور به همراه معادلات مربوطه نشان می دهند.



شکل ۲- اثر دما و زمان بر میزان پروتئین همراه با آلژینات

Figure 2. Effect and time on protein content with alginate

$$Y=0.1-0.1 X_2+0.31 X_1^2$$



شکل ۳- اثر دما و زمان بر میزان پلی فنل همراه با آلژینات

Figure 3. Effect and time on polyphenol content with alginate

$$Y=0.035-0.004 X_2+0.012 X_1^2$$

تعیین شرایط بهینه استخراج اسیدی

بهترین شرایط استخراج باید درصد راندمان بالای استخراج آلزینات و میزان پروتئین و پلی فنل استخراج شده‌ی بسیار پایینی همراه با آلزینات داشته باشد. بر اساس شرایط گفته شده، پارامترهای درجه حرارت و زمان بهینه برای اسید کلریدریک ۰/۲ مولار به صورت درجه حرارت ۶۰°C و زمان ۳ h تعیین شد.

مرحله قلیایی

در گام دوم دامنه تغییرات فاکتورهای مرحله قلیایی (کربنات سدیم) برای دما ۶۰-۹۰°C و زمان ۲-۴ h و غلظت ۲-۴٪ (وزنی / حجمی) انتخاب گردید که بر اساس آن جدول شماره ۳ طرح آماری با ۱۸ استخراج معین شد. در این طرح دما (X_1) و زمان (X_2) و غلظت (X_3) سه فاکتور مؤثر و درصد بازده استخراجی، مقدار پلی فنل‌ها و ویسکوزیته ظاهری آلزینات سدیم استخراج شده، سه متغیر وابسته بودند. مطابق با تجزیه و تحلیل انجام شده بهترین مدل برای بهینه سازی اثر متغیرها بر پاسخ‌های مورد بررسی، برای درصد راندمان استخراج مدل درجه دوم و برای دو متغیر میزان پلی فنل و ویسکوزیته‌ی آلزینات استخراج شده مدل فاکتور متقابل دوگانه بود. تجزیه واریانس داده برای بدست آوردن ضریب رگرسیون، مقدار P ، مقدار F و نقص انطباق در جدول شماره ۴ آمده است.

اثر شرایط قلیایی بر درصد راندمان استخراج آلزینات

عوامل غلظت، زمان و دما بر درصد راندمان استخراج اثر معنی دار داشتند ($P < 0.01$) و از طرفی اثر بر همکنش غلظت و زمان (β_{12}) و زمان و دما (β_{23}) بر درصد راندمان معنی دار بود.

تأثیر غلظت کربنات سدیم بر مقدار راندمان استخراج به صورت فزاینده بود. با افزایش غلظت کربنات سدیم، میزان راندمان استخراج با یک شیب صعودی افزایش می‌یابد. کربنات سدیم باعث جایگزینی سدیم در گروه‌های کربوکسیلیک اسید آلزینیک می‌گردد و نمک آلزینات سدیم حاصل می‌گردد بنابراین افزایش غلظت باعث جایگزینی

بیشتر یون کلسیم شده و راندمان استخراج آلزینات افزایش می‌یابد. این افزایش راندمان استخراج تا جایی افزایش می‌یابد که تمامی گروه‌های کربوکسیلیک با یون سدیم جایگزین گردد و بعد از آن راندمان استخراج ثابت مانده و حتی در اثر تأثیر غلظت بالا و دپلمیریزه شدن آلزینات، باعث کاهش راندمان استخراج می‌شود. این نتایج با نتایج تحقیقات مازومدر و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت دارد. آنان در تحقیقات خود اعلام کردند کربنات سدیم تا غلظت ۳٪ (وزنی / حجمی) باعث افزایش درصد راندمان استخراج می‌شود اما پس از آن به علت دپلمیریزاسیون آلزینات و کاهش وزن مولکولی پلی ساکارید درصد راندمان کاهش می‌یابد.

برای نفوذ محلول کربنات سدیم به داخل بافت و تبدیل اسید آلزینیک به آلزینات سدیم به زمان نیاز است. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد فاصله زمانی ۲ تا ۳ ساعت برای نفوذ محلول به داخل بافت و نیز جایگزینی کامل یون سدیم در گروه‌های کربوکسیلیک مربوط به اسید آلزینیک کافی است و بالاترین راندمان در این فاصله صورت می‌گیرد و بعد از آن به دلیل طولانی شدن تماس آلزینات سدیم حاصل شده با کربنات سدیم اضافی که دارای pH قلیایی است و به دلیل تأثیر سوء این pH و دپلمیریزاسیون آلزینات راندمان استخراج کاهش می‌یابد. مازومدر و همکاران (۲۰۱۶) نیز اعلام کردند افزایش زمان از ۰/۵ تا ۳ ساعت باعث افزایش راندمان استخراج شده و بالاترین راندمان بعد از ۳ ساعت حاصل می‌شود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

اثر متقابل فاکتورهای غلظت کربنات سدیم- زمان در سطح احتمال ۵٪ معنی دار بود و نشان دهنده تأثیر توأم فاکتورها بر میزان راندمان استخراجی می‌باشد که نمودار سه بعدی آن در شکل ۴ آمده است. در صورت تأثیر هم زمان این دو فاکتور، غلظت‌های بالا باعث تشدید تأثیر عامل زمان شده و بیشترین کاهش راندمان در زمان‌های طولانی و غلظت‌های بالا اتفاق می‌افتد. بیشترین راندمان

درصد راندمان استخراج می شود. در هر دمای مشخص با افزایش زمان، راندمان استخراج کاهش می یابد و دما تأثیر عامل زمان را افزایش می دهد بدین معنی که تأثیر افزایش زمان در میزان کاهش درصد راندمان استخراج آلژینات در دماهای بالا بیشتر است. معادله مربوط به تأثیر فاکتورها بر میزان درصد استخراج آلژینات به صورت زیر می باشد.

استخراج در محدوده ی ۳ تا ۳/۵ درصد غلظت و زمان ۲ تا ۲/۵ ساعت می باشد. با افزایش درجه حرارت میزان راندمان استخراج کاهش می یابد در واقع مقدار راندمان با افزایش دما نسبت عکس دارد. با افزایش درجه حرارت به علت شکستن پیوندها و دپلمریزاسیون آلژینات راندمان استخراج کاهش می یابد. اثر متقابل فاکتورهای زمان - درجه حرارت در سطح ۱ % معنی دار بود که نمودار سه بعدی آن در شکل ۵ آمده است. افزایش دما طی زمان های طولانی باعث کاهش

$$Y=30.14+0.91*X_1-1.53*X_2-4.35*X_3-0.51X_1*X_2-1.09 X_2*X_3-4.58X_1^2- 1.56X_2^2$$

جدول ۳- مقادیر سطوح فاکتورها و نتایج حاصل از آزمایش ها بر روی آلژینات های استخراجی

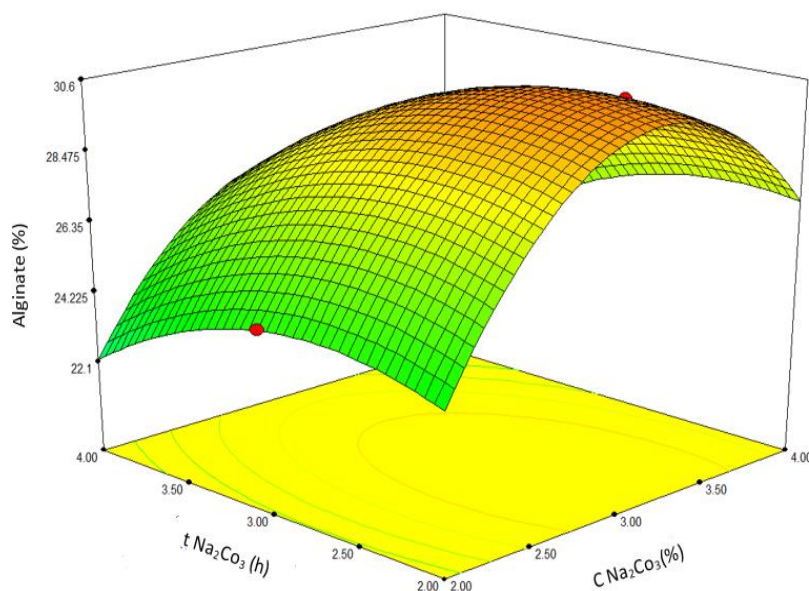
Table 3- Values of factor levels and results of experiments on extracted alginates

sample	Temperature (°C)	code	Time (h)	code	Concentration (% w/v)	code	Alginate extraction yield (% w/w)	Polyphenols (mg/g)	Viscosity (cP)
1	60	-1	4	+1	2	-1	27.2	0.024	53.8
2	90	+1	2	-1	2	-1	18.8	0.017	41.5
3	90	+1	4	+1	2	-1	16.2	0.022	40.8
4	90	+1	2	-1	2	-1	20.2	0.021	44.2
5	90	+1	3	0	3	0	24.3	0.024	27.5
6	60	-1	4	+1	2	-1	25.9	0.027	50
7	75	0	2.5	+0.5	3.5	+0.5	30.1	0.020	34.5
8	60	-1	2	-1	2	-1	26.3	0.023	46.7
9	60	-1	4	+1	4	+1	27.1	0.013	40.7
10	90	+1	2	-1	4	+1	23.1	0.023	19.2
11	90	+1	4	+1	2	-1	15.1	0.020	35.8
12	75	0	3	0	2	-1	24.7	0.024	39.2
13	60	-1	2	-1	3	0	32.8	0.018	42.8
14	75	0	4	+1	3	0	26.9	0.021	37.5
15	60	-1	3	0	4	+1	29.9	0.013	42
16	90	+1	4	+1	4	+1	16.9	0.024	15
17	60	-1	2	-1	4	+1	28.4	0.016	41.3
18	90	+1	4	+1	4	+1	15.9	0.022	17

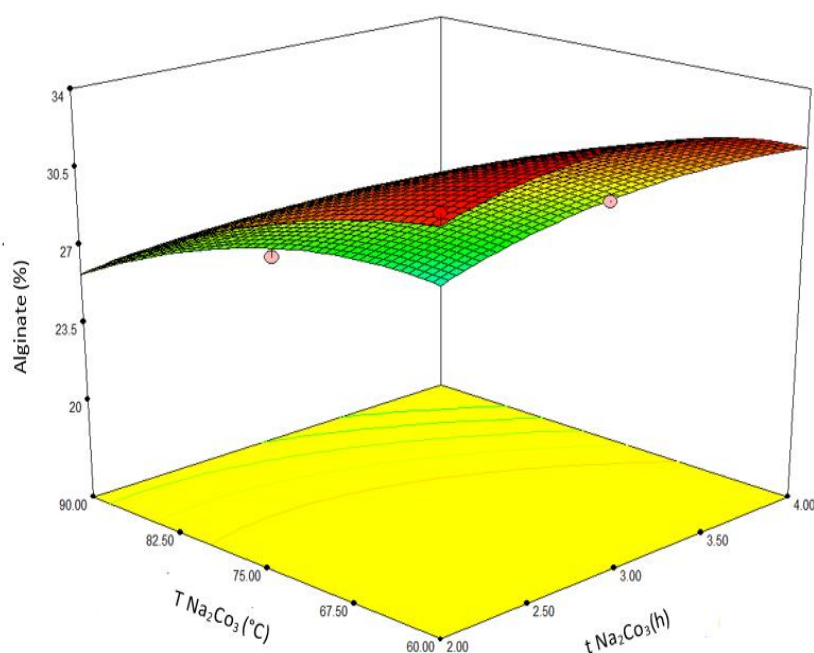
جدول ۴- مقادیر ضرایب برآورد شده مدل انتخابی برای صفات مورد مطالعه و نتایج تجزیه واریانس
Table4-The assessed coefficients contents of the selected model for the studied attributes and the results of the analysis of variance

Extraction yield					Viscosity				Polyphenols			
	coefficient s	Mean square s	F	P value	coefficient s	Mean square s	F	P value	Coefficient s	Mean squares	F	P value
model	Quadratic	55.2	111.1	<0.000	2FI	32.226	52.26	<0.000	2FI	2.41*10 ⁻⁴	1.59	0.0002
β_0	+30.14	---	---	---	+36.94	---	---	---	+0.021	---	---	---
β_1	+0.91	10.62	21.25	<0.001	-7.2	70.269	11.85	<0.000	-0.002	4.97*10 ⁻⁵	17.7	0.0015
β_2	-1.53	29.95	59.93	<0.000	-0.22	0.66	0.11	0.75	+0.0003	1.51*10 ⁻⁶	0.54	0.479
β_3	-4.35	268.76	53.78	<0.000	-8.08	92.268	14.98	<0.000	+0.0013	2.65*10 ⁻⁵	9.44	0.01
β_{12}	-0.57	3.66	7.23	0.027	-0.48	2.56	1.41	0.53	-0.0009	1.05*10 ⁻⁵	3.75	0.079
β_{13}	+0.13	0.2	0.4	0.544	-3.69	17.31	27.33	0.0003	+0.0033	1.38*10 ⁻⁵	49.1	<0.000
β_{23}	-1.09	14.34	28.7	0.0007	-1.85	42.76	6.86	0.0238	+0.0002	6.15*10 ⁻⁷	0.22	0.649
β_1^2	-4.58	44.13	88.31	<0.000	---	---	---	---	---	---	---	---
β_2^2	-1.56	5.09	10.19	0.012	---	---	---	---	---	---	---	---
β_3^2	-1.06	1.91	3.83	0.086	---	---	---	---	---	---	---	---
R ²	0.99	---	---	---	0.96	---	---	---	0.88	---	---	---
Lack of fit	---	0.29	0.4	0.80ns	---	6.17	0.97	0.54ns	---	1.52*10 ⁻⁶	0.3	0.92ns

β_1 , β_2 and β_3 represent calculated coefficients for concentration, time and temperature of extraction, respectively
The parameters β_i , β_{ii} and β_{ij} represent the linear, quadratic, and interaction effects of the independent variables.
ns represent a non-significant effect at $P < 0.05$.



شکل ۴- اثر هم زمان غلظت و زمان بر درصد راندمان
Figure 4- Effect of concentration time and time on extraction yields



شکل ۵- اثر هم زمان درجه حرارت و زمان بر درصد راندمان
Figure 5- Effect of time and temperature on extraction yields

اثر شرایط قلیایی بر ویسکوزیته

برای ویسکوزیته مدل فاکتور متقابل دوگانه انتخاب شد. تأثیر فاکتورهای غلظت و دما بر ویسکوزیته در سطح ۱ درصد معنی دار بودند و هر دو بر میزان ویسکوزیته آلژینات استخراجی تأثیر داشته و با افزایش هر یک از آنها ویسکوزیته کاهش می یابد. تأثیر دما نسبت به غلظت بر ویسکوزیته بیشتر است. از طرفی این دو فاکتور در سطح ۱ درصد به صورت متقابل بر ویسکوزیته موثر هستند و در هنگام تأثیر متقابل این دو فاکتور اثر غلظت در دماهای بالاتر، بیشتر می شود بدین معنی که کمترین ویسکوزیته مربوط به بالاترین درجه حرارت و بالاترین غلظت می باشد که منفی بودن ضریب β_{13} تأیید کننده موضوع است و با کار ماهرانی و همکاران (۱۳۸۳) مطابقت دارد.

فاکتورهای زمان و درجه حرارت در سطح ۵ درصد (ضریب β_{23}) به صورت متقابل بر میزان ویسکوزیته موثر بودند. تأثیر فاکتور زمان بر ویسکوزیته به تنهایی معنی دار نبود، بنابراین در دما و غلظت ثابت، تغییر زمان، تأثیری بر میزان ویسکوزیته ندارد ولیکن در هنگام تأثیر

متقابل با دما، افزایش دما طی زمانهای طولانی استخراج باعث کاهش میزان ویسکوزیته می شود، یعنی هرچه زمان استخراج بیشتر باشد تأثیر افزایش دما در کاهش ویسکوزیته بیشتر است. عباسی و همکاران (۱۳۸۴) اعلام کردند حرارت دادن طولانی مدت می تواند ساختار پلی ساکارید را تجزیه کرده و باعث کاهش گرانروی ظاهری به طور برگشت ناپذیر گردد. همچنین گومز و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که با افزایش دما گرانروی ظاهری محلول های آلژینات کاهش می یابد.

اثر شرایط قلیایی بر پلی فنل ها

برای پلی فنل ها نیز مانند ویسکوزیته، مدل فاکتور متقابل دوگانه انتخاب شد. تأثیر فاکتورهای غلظت و درجه حرارت بر مقدار پلی فنل ها معنی دار بودند و هر دو به صورت خطی بر میزان ویسکوزیته آلژینات استخراجی تأثیر دارند. با افزایش غلظت میزان پلی فنل ها کاهش می یابد که به علت افزایش pH می باشد و بر عکس با افزایش درجه حرارت میزان پلی فنل ها افزایش می یابد که علت آن می تواند شکستن پیوندها و آزاد شدن گروه های فنلی

بیشتر باشد. از طرفی این دو فاکتور در سطح ۱ درصد به صورت متقابل بر میزان پلی فنل‌ها موثر هستند و افزایش دما در غلظت‌های بالا باعث کاهش میزان پلی فنل‌ها می‌شود. کمترین میزان پلی فنل در دمای پایین و غلظت بالا به دست می‌آید.

تأثیر فاکتور زمان بر میزان پلی فنل‌ها به تنهایی و همچنین تأثیر متقابل آن با دما و غلظت معنی دار نبود، بنابراین تغییر زمان تأثیری بر میزان پلی فنل‌ها ندارد.

تعیین شرایط بهینه استخراج قلیایی

بهترین شرایط استخراج باید درصد راندمان استخراج و ویسکوزیته‌ی بالا و میزان پلی فنل استخراج شده‌ی بسیار پایینی همراه با آلژینات داشته باشد، بنابراین باید محدوده‌ی آن را تعیین نمود که باعث خروج مقدار بسیار کمی پلی فنل همراه این پلی ساکارید شود. بر اساس شرایط گفته شده، پارامترهای درجه حرارت، زمان و غلظت بهینه برای کربنات سدیم به صورت درجه حرارت 60°C و زمان ۲ h و غلظت ۲٪ (وزنی/وزنی) تعیین شد که نتیجه‌ی آن

استخراج آلژینات با راندمان ۳۲/۵ درصد، ویسکوزیته ۴۴/۶۷ سانتی پواز و میزان ۰/۰۱۵ میلیگرم در گرم پلی فنل همراه با آلژینات می‌باشد.

بحث

شرایط بهینه برای استخراج بالاترین درصد آلژینات با کمترین ناخالصی (پروتئین و پلی فنل) و بالاترین ویسکوزیته استفاده از اسیدکلریدریک ۰/۲ مولار در دمای 60°C و مدت زمان ۳ h و به دنبال آن استفاده از کربنات سدیم با غلظت ۳٪، درجه حرارت 60°C و زمان ۳ h می‌باشد که درصد راندمان پیش بینی شده توسط نرم افزار ۳۲/۸٪ (وزنی/وزنی) بود. به منظور تأیید شرایط بهینه، استخراج آلژینات در شرایط مذکور انجام گرفت و میزان راندمان استخراج شده به میزان ۳۲/۵٪ (وزنی/وزنی) گزارش شد که با میزان تعریف شده توسط نرم افزار مطابقت دارد.

منابع مورد استفاده

- آریان فر ا، شهیدی ف، کدخدائی ر، وریدی م، ۱۳۹۴. بررسی عوامل موثر بر استخراج پلی فنل‌ها و فعالیت آن‌تی اکسیدانی چای سبز، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد یازدهم، شماره ۴، صفحه‌های ۲۸۵ تا ۲۹۵.
- شمسی ش، رفوگری نژاد ل، ۱۳۹۷. بهینه سازی فرمولاسیون شیر عسل حاوی دارچین با روش سطح پاسخ، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، جلد بیست و هشتم، شماره ۱، صفحه‌های ۱۲۱ تا ۱۳۳.
- عباسی س، رحیمی س، ۱۳۸۴. بررسی تأثیر غلظت، دما، pH و سرعت چرخشی روی رفتار جریان محلول صمغ کتیرای ایرانی، فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، دوره دوم، شماره ۴، صفحه‌های ۲۹ تا ۴۲.
- ماهرانی ب، برزگر م، سحری م ع و دهقانی ح، ۱۳۸۳. بهینه سازی شرایط استخراج صمغ دانه بزرک ایرانی به روش سطح پاسخ، علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، جلد هشتم، شماره ۴، صفحه‌های ۱۴۵ تا ۱۵۵.
- Calumpong PH, Maypa PA and Magbanua M. 1999. Population and alginate yield and quality assessment of four Sargassum species in Negros Island, central Philippines. *Hydrobiologia* 398: 211– 215.
- Chandini SK, Ganesan P and Bhaskar N, 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry* 107: 707-713.
- Cui W, Mazza G, Oomah BD and Biliaderis CG, 1994. Optimization of aqueous extraction process for flaxseed gum by response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology* 27: 363-369.
- Davis TA, Llanes F, Volesky B and Mucci A, 2003a. Metal selectivity of Sargassum spp. and their alginates in relation to their α -L-guluronic acid content and conformation. *Environmental Science and Technology* 37: 261–267.

- De Sousa APA, Torres MR, Pessoa C, de Moraes MO, Filho FDR, Alves APNN and Costa-Lotufo LV, 2007. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Carbohydrate Polymer* 69: 7–13.
- Draget KI and Taylor C, 2011. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids* 25: 251–256.
- Gómez-Díaz D and Navaza MJ, 2003. Rheology of aqueous solutions of food additives: Effect of concentration, temperature and blending. *Journal of Food Engineering* 56: 387-392.
- Haug A, Larsen B, 1962. Qunantitative Determination of the Uronic Acid Composition of Alginates. *Acta Chemica Scandinavica* 16: 1908-1918.
- Jhoo JW, Lo CY, Li S, Sang S, Heinze T and Ho TC, 2005. Stability of Black Tea Polyphenol, Theaflavin, and Identification of Theanaphthoquinone as Its Major Radical Reaction Product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:6146-6150.
- Jouki M, Mortazavi SA, Yazdi FT and Koocheki A, 2014. Optimization of extraction, antioxidant activity and functional properties of quince seed mucilage by RSM. *International Journal of Biological Macromolecules* 66:113-124.
- Karaki N, Sebaaly C, Chahine N, Faour T, Zinchenko A, Rachid S and Kanaan H, 2013. The antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the brown algae *Dictyopteris polypodioides* growing on the Lebanese coast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3: 43–51
- Komatsu Y, Suematsu S, Hisanobu Y, Saigo H and Matsuda R, 1992. Effect of PH and Temperature on Reaction Kenetics in Green Tea Infusion. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 57(6): 907- 910
- Kumar M, Gupta V, Kumari P, Reddy CRK and Jha B, 2011. Assessment of nutrient composition and antioxidant potential of Caulerpaceae seaweeds. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 270–278.
- Lin DS, Lio EH and Mau JL, 2008. Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea. *Journal of Food Science and Technology*. 41: 1616-1623.
- Lourenço SO, Barbarino E, De-Paula JC, Pereira LOS, Marquez UML, 2002. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research* 50: 233–241.
- Mazumder A, Løvstad Holdt S, De Francisci D, Alvarado-Morales M, Mishra H N and Angelidaki I, 2016. Extraction of alginate from *Sargassum muticum*: process optimization and study of its functional activities. *Journal of Applied Phycology* 28: 3625–3634.
- Mæhre HK, Malde MK, Eilertsen KE and Elvevoll EO, 2014. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 3281–3290.
- Miyashita K, Mikami N and Hosokawa M, 2013. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *Journal of Functional Foods*. 5: 1507-1517.
- Paiva L, Lima E, Patarra RF, Neto AI and Baptista J, 2014. Edible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health. *Food Chemistry* 164: 128–135.
- Pawar SN and Edgar KJ, 2012. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33: 3279–3305.
- Penman A and Sanderson GR, 1972. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Research* 25: 273–282.
- Percival E and McDowell RH, 1990. *Methods in Plant Biochemistry*. in: P.M. Dey (ed.). Academic Press, New York.
- Sime Wilma J, 1990. Alginates, Food Gels, in: P. Harris (ed.). Elsevier Science Publishers Ltd., England.
- Singleton VL and Rossi JA, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144–158.

- Torres MR, Sousa APA, Silva Filho EAT, Melo DF, Feitosa JPA, de Paula RCM and Lima MGS, 2007. Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. *Carbohydrate Research* 342: 2067–2074.
- Venugopal V, 2011. *Marine Polysaccharides: Food Applications*, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 396.
- Villarreal-Gómez LJ, Soria-Mercado IE, Guerra-Rivas G and Ayala-Sánchez NE, 2010. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de biología marina y oceanografía* 45: 267–275.
- Yang, JS, Xie YJ and He W, 2011. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers* 84: 33–39.
- Zykwinska A, Rondeau-Mouro C, Garnier C, Thibault JF and Ralet MC, 2006. Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls. *Carbohydrate Polymer* 65: 510–520.

Optimization of sodium alginate extraction conditions from an Iranian brown algae (*Nizimuddinina zanardini*) using response surface methodology

R Abka Khajouei^{1*}, J Keramat² and N Hamdami²

Received: February 1, 2018

Accepted: November 6, 2018

¹PhD Student, Department of Food Science, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

²Associated Professor, Department of Food Science, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

*Corresponding author: E mail: r_abka@yahoo.com

Introduction: Macroalgae are source of many polysaccharides. Based on their pigments content they are divided into brown, green and red algae having specific polysaccharide contents. Among them, brown algae (Phaeophyceae) are source of alginates and/or fucans or fucoidans (Percival and McDowell 1990, Torres et al., 2007). Alginates are anionic polysaccharide that existences in mixer of salt forms (Na^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+}) in cell walls of brown algae makes the tissues flexible and strong. They consist of (1,4) linked β -d-mannuronic acid (M) with $^4\text{C}_1$ ring conformation and α -l-guluronic acid (G) with $^1\text{C}_4$ ring conformation, the two uronic acids being in pyranosic conformation (Pawar and Edgar 2012, De Sousa et al., 2007). They offer three varying sequences identified as the blocks MG consisting of nearly equal proportion of both monomers with a high number of MG (or GM) dimmers, the blocks GG and the blocks MM (Haug and Larsen 1962). M/G ratio, length and distribution of sequences depend on the algae species but also on their growth conditions and geographic origins. It also determines the chemical and physical properties of alginates (Karaki et al., 2013). Indeed, their gelling properties are dependent on guluronic acid content and explained by the structural features of GG blocks where selective alkaline earth metal multivalent cations and notably Ca^{2+} take place by chelation. This phenomenon is known and explained as the “egg-box” model. The formed gel is not soluble in water. However, sodium alginate is a water-soluble polymer having generally pseudo plastic properties in solution (Draget and Taylor 2011). Polysaccharides have wide range of pharmacological activities and some of them are considered as antitumor, antihypertensive, immunomodulator as well as antioxidant agents. Their radical scavenger’s role can be used to inhibit oxidative damage in foods and improve their nutritional quality (Venugopal 2011, Yang et al., 2011).

Material and methods: Twenty-five gram of dried algae (*Nizamuddinina zanardinii*) was soaked under steering at room temperature for 24 h in 800 mL of 2% (v/v) formaldehyde to remove phenolic compounds and pigments. After that, the insoluble fraction was washed 3 times with MilliQ water and supplemented by 800 mL of 0.2 M HCL before to be incubated at different levels (25-60°C) for different extraction time periods (0.5-3 h) under stirring (250 rpm). After optimizing of acidic step, the suspension was then centrifuged (10000 g for 20 min at 20°C) and pellets with alginic acid were washed 3 times with MilliQ water before to be soaked in a range from (2-4 % (w/v)) Na_2CO_3 solution for different levels (2-4 h) at different extraction time periods (60-90 °C). The mixture was centrifuged (10000 g for 30 min at 20°C) and the supernatant was precipitated with 3 volumes of ethanol 96 % (v/v). Pellets containing sodium alginate were dissolved in MilliQ water and precipitated with ethanol as described above. This step was repeated two times before to collect and freeze dried the sodium alginate. Response surface methodology (RSM) was used to study the effect of extraction temperature; X_1 extraction time; X_2 for acidic step and concentration; X_1 , extraction time; X_2 ; extraction temperature X_3 for alkaline step. A D-optimal design was employed for designing experimental data using Design-Expert 10.0.3 trial software (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

Results and discussion: Both temperature and time factors have a significant effect on the extraction efficiency and the effect of temperature on extraction efficiency is higher than the effect of time in acidic step. There is also a significant interaction between the two variables of temperature and time. The extraction temperature had an increasing effect on alginate extraction efficiency. Chloridric acid disrupts the cell wall and releases alginate and also converts alginate salts in the cell wall into arginic acid. Increasing temperature causes further cellular breakdown and alginate extraction efficiency increases. With increasing time, the extraction efficiency increased. This increase can be due to the fact that the acid needs time to penetrate the cell wall, and as the time increases, the permeability increases, resulting in the extraction efficiency, so that the permeability is complete and the highest efficiency is obtained and After that, the extraction efficiency remains constant and even due to the long-lasting effect of acid, it causes de-polymerization and decreases the extraction efficiency. Increasing temperature increased the effect of time factor, meaning that the interaction of temperature and time had a significant effect on extraction efficiency. At low temperatures, the effect of time on the extraction efficiency is low because of the breakdown of the cell wall, but at higher temperatures, which contribute to the thermal breakdown of the cell wall, the effect of time variation is more evident. In alkaline step the effect of concentration on extraction efficiency was considered as a quadratic equation and as interaction with extraction time. By increasing the concentration of sodium carbonate, the extraction efficiency increases with an ascending slope. In other words, the amount of efficiency increases with an increase in direct concentration. Sodium carbonate causes the sodium substitution in carboxylic acid arginine groups and sodium alginate salts are obtained. Therefore, increasing concentration results in more calcium ion replacement and alginate extraction efficiency increases. This increase in extraction efficiency is increased to the extent that all carboxylic groups are replaced by sodium ion, and after that the extraction efficiency remains constant, and even due to the high concentration and de-polymerization of the alginate, it reduces the extraction efficiency. With increasing time of extraction with sodium carbonate, the extraction efficiency decreases with a second order gradient. Sodium ion has been completely replaced in argonic acid groups during the initial extraction hours, and if the extraction time is increased due to the prolonged contact, sodium alginate is obtained with an excess of sodium carbonate which has an alkaline pH and because of the adverse effect of this pH Extraction efficiency is reduced. The effect of temperature on extraction efficiency was considered as a first-order equation and as interaction with extraction time. As the temperature rises due to breaking of the bonds that may lead to the separation of sodium ions and also cause de-polymerization of the alginate, the extraction efficiency decreases.

Conclusion: Chloridric acid disrupts the cell wall and releases alginate and also converts alginate salts in the cell wall into alginic acid. the acid needs time to penetrate the cell wall. The results showed that in acidic step temperature and time are two major effective factors on yield and quality of extracted alginate. Sodium carbonate causes the sodium substitution in carboxylic acid arginine groups and sodium alginate salts are obtained. Sodium ion has been completely replaced in argonic acid groups during the initial extraction hours, in high temperature may lead to the separation of sodium ions and also cause de-polymerization of the alginate so in alkaline step, all factors have effect on yield, polyphenol and apparent viscosity of extracted polymer. The optimized conditions of extraction of sodium alginate from brown algae (*Nizimuddinia zanardini*) were as follows: temperature: 60 °C, time: 3 h (acidic step) and temperature: 60 °C, time: 3 h and concentration 3 % w/v (alkaline step).

Keywords: Sodium alginate, Optimization of Extraction, Polysaccharide, Iranian brown algae, Response surface methodology