



دانشگاه گیلان

بهره‌برداری و پرورش آبزیان

جلد چهارم، شماره اول، بهار ۱۳۹۴

<http://japu.gau.ac.ir>

بررسی روند تغییرات نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل آگار جلبک پرورشی *Gracilariopsis persica* در شرایط مختلف استخراج

محمدرضا انتصاریان بیدگلی^۱، *مسعود رضایی^۲ و علی معتمدزادگان^۳

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تربیت مدرس، نور،

^۲استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تربیت مدرس، نور،

^۳استادیار گروه صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷

چکیده

آگار، ترکیب بیوپلیمیری ژله‌ای است که می‌توان از دیواره سلولی برخی جلبک‌های قرمز استخراج نمود. در این پژوهش تأثیر شرایط مختلف استخراج بر نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل آگار استحصالی از جلبک پرورشی گراسیلاریوپسیس پرسیکا با استفاده از رویه سطح پاسخ^۱ (RSM) مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای غلظت قلیا (۲، ۳/۲، ۵، ۶/۸ و ۸ درصد w/v)، دما (۹۰، ۹۶، ۱۰۵، ۱۱۴ و ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان استخراج (۴۵، ۸۵، ۱۴۲، ۲۰۰ و ۲۴۰ دقیقه) در ۵ سطح به‌کار گرفته شدند. بر اساس نتایج دما و زمان استخراج از جمله متغیرهای معنادار بر نقطه ذوب آگار بودند ($P < 0/05$) در حالی که تأثیر هیچ یک از متغیرهای ورودی بر دمای تشکیل ژل معنادار نبود ($P > 0/05$). مدل چندجمله‌ای به‌منظور تعیین نقطه بهینه برای نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل محاسبه گردید. مقادیر بهینه متغیرهای مستقل با استفاده از روش تابع مطلوب شامل غلظت قلیا ۳/۲ درصد، دما ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۲۰۰ دقیقه بودند. آزمایشات تأییدی برای نقطه ذوب $102/6 \pm 0/84$ درجه سانتی‌گراد و دمای تشکیل ژل $38/16 \pm 0/44$ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمدند. تطابق مقادیر واقعی با مقادیر پیشنهادی حاکی از توانمندی مدل بود ($P > 0/05$).

واژه‌های کلیدی: آگار، دمای تشکیل ژل، نقطه ذوب، روش سطح پاسخ، *Gracilariopsis persica*

*مسئول مکاتبه: rezai_ma@modares.ac.ir

مقدمه

آگار، ترکیب بیوپلیمر ژله‌ای است که بر اساس تخریب دیواره سلولی از برخی آگاروفیت‌هایی چون گراسیلاریا^۱ و ژیلیدیوم^۲ استحصال می‌گردد. اگر چه بخش قابل توجه منبع آگار در جهان از جلبک‌های گراسیلاریا می‌باشد، اما این آگاروفیت به دلیل وجود میزان سولفات بالا، آگاری با کیفیت پایین تولید می‌نماید. لذا به منظور بهبود خواص ژلی، فرآیند پیش‌فرآوری قلیایی صورت می‌پذیرد (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹). آگار جهت تشکیل ژل و ذوب آن دارای دامنه تغییرات می‌باشد و اختلاف درجه حرارت بین این دو بسته به نوع گونه و شرایط استخراج می‌باشد. در واقع عملکرد آگار در صنعت، اغلب به توانایی تشکیل ژل‌های برگشت‌پذیر حرارتی وابسته می‌باشد، بنابراین خواص ژلی چون نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل، پارامترهای مهم در کنترل کیفیت آگار محسوب می‌شوند (پیریرا-پاچکو و همکاران، ۲۰۰۷). آگار به دلیل دارا بودن طبیعت غیرقابل هضم، حالت کلونیدی و خواص ژلی، کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف پیدا کرده است. این فیکوکلونید که یکی از رایج‌ترین ترکیب‌ها و افزودنی‌های مجاز غذایی است حدود ۸۰ درصد در این صنعت و ۲۰ درصد برای مصارف بیوتکنولوژی کاربرد دارد (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹).

با توجه به کاربرد کلونید آگار، انتخاب آگاروفیت مناسب نیز حائز اهمیت است. با توجه به مطالعات اخیر، جلبک *Gracilariopsis persica* از گونه‌های شناسایی شده جدیدی است که علاوه بر مزیت جمعیت‌های رویشی در سواحل جنوبی، امکان پرورش آن نیز در کشور میسر گردیده است. بنابراین می‌توان این آگاروفیت را به عنوان یکی از منابع استخراج آگار در ایران برشمرد (متین‌فر و همکاران، ۲۰۱۳). اگرچه مطالعات متنوعی بر روی خواص ژلی آگاروفیت‌های مختلفی صورت پذیرفته (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹؛ لی و همکاران، ۲۰۰۸؛ پیریرا-پاچکو و همکاران، ۲۰۰۷) اما تاکنون مطالعات مربوط به ارزیابی خواص ژلی آگار این گونه منتشر نشده است، لذا انجام پژوهش‌ها در این مورد ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی روند نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل آگار جلبک پرورشی *Gp. persica* در شرایط مختلف استخراج با به کارگیری متدولوژی سطح پاسخ می‌باشد. چرا که امروزه این روش به دلیل نتایج قابل قبول آن در بخش‌های مختلف به خصوص پژوهش و صنعت، به طور گسترده‌ای برای مدل‌سازی و بهینه‌سازی استفاده می‌شود (خوری و مخوپادیای، ۲۰۱۰).

1- *Gracilaria*

2- *Gelidium*

مواد و روش‌ها

آگاروفیت *Gp. persica* از سایت پرورشی استان هرمزگان تهیه گردید. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده (سدیم هیدروکسید، دی هیدروژن پتاسیم فسفات و دی پتاسیم هیدروژن فسفات) از شرکت شارلو تهیه شدند. تجهیزاتی چون حمام روغن، حمام آب، خشک کن حرارتی، آسیاب صنعتی، pH متر مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی آگاروفیت: گونه پرورشی *Gp. persica* از سایت‌های پرورشی واقع در استان هرمزگان تحت نظارت سازمان شیلات در اردیبهشت ماه سال جاری تهیه شدند. توده‌های جلبکی پس از شست‌وشو، ابتدا ۲۴ ساعت در زیر آفتاب و سپس در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۸ ساعت قرار گرفتند. پس از پودر نمودن با دستگاه آسیاب صنعتی و عبور از الک با مش ۶۰ (اندازه سایز ۲۵۰ تا ۳۰۰ میکرومتر)، آگاروفیت مذکور در کیسه‌های پلی‌اتیلن نگهداری شدند (پیریرا- پاچکو و همکاران، ۲۰۰۷).

فرآیند استخراج آگار: جهت استخراج آگار، ۱۰ گرم پودر جلبک ۱۲ ساعت در غلظت‌های معین محلول سدیم هیدروکسید در دمای محیط غوطه‌ور گردید (جدول ۱). سپس در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۳ ساعت حرارت داده شد. پس از شست‌وشو با آب مقطر، فرآیند استخراج از جلبک‌های پیش‌فرآوری شده، در ۳۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۶/۲ در دماها و زمان‌های مشخص شده صورت پذیرفت (جدول ۱). پس از تخلیص، ۱۲ ساعت در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید. پس از انجمادزدایی در دمای محیط، ناخالصی‌های محلول تخلیه شدند. در پایان با دستگاه خشک‌کن حرارتی برای یک شبانه‌روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. عملیات استخراج آگار بومی (بدون پیش‌فرآوری) نیز در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای ۹۰ دقیقه در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار در حمام آبی صورت گرفت (فریل- پلگرین و مورانو، ۲۰۰۵).

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

آزمایشات					محدوده	علامت	متغیرهای مستقل
$+\alpha$	+۱	۰	-۱	$-\alpha$			
۸	۶۸	۵	۳/۲	۲	۲-۸	A	غلظت قلیا (%w/v)
۱۲۰	۱۱۴	۱۰۵	۹۶	۹۰	۹۰-۱۲۰	B	دما (درجه سانتی‌گراد)
۲۴۰	۲۰۰	۱۴۲	۸۵	۴۵	۴۵-۲۴۰	C	زمان (دقیقه)

تعیین نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل: پس از تهیه محلول ۱/۵ درصد w/v آگار در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، تعیین نقطه ذوب و دمای تشکیل ژل مطابق با روش (فریل - پلگرین و روبلدو، ۱۹۹۷) صورت پذیرفت.

جهت اندازه‌گیری نقطه ذوب ژل، محلول آگار به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه 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 به‌عنوان نقطه ذوب ژل گزارش گردید.

برای دمای تشکیل ژل نیز محلول آگار به لوله آزمایش (ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر و قطر ۱۵ میلی‌متر) منتقل گردید. سپس یک گوی (وزن ۶ میلی‌گرم، قطر ۱۰ میلی‌متر) درون لوله رها شد. لوله را درون حمام آبی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تکان داده تا حرکت گوی متوقف گردد. سپس دما با یک ترمومتر دقیق به‌عنوان دمای تشکیل ژل گزارش گردید.

طرح آزمایشات: آزمایش‌های استخراج با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت^۱ در قالب طرح چرخشی مرکب مرکزی^۲ (CCRD) با ۶ تکرار در نقطه مرکزی برای ۳ متغیر مستقل در ۵ سطح انجام شد (جدول ۱). مقدار آزمایشگاهی و پیش‌بینی شده مدل نیز برای هر پاسخ ثبت گردید (جدول ۲) تا تفاوت عددی آن‌ها نیز بهتر مشخص گردد.

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

2- Central Composite Rotatable Design

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

ردیف	متغیرها			دمای تشکیل ژل		نقطه ذوب ژل	
	A	B	C	آزمایش	مدل	آزمایش	مدل
۱	۵	۱۰۵	۱۴۲	۳۸/۵۰	۳۷/۹۹	۹۹/۸۰	۹۸/۹۲
۲	۵	۱۰۵	۱۴۲	۳۹/۰۰	۳۷/۹۹	۹۹/۲۰	۹۸/۹۲
۳	۵	۱۰۵	۱۴۲	۳۷/۴۵	۳۷/۹۹	۹۷/۰۰	۹۸/۹۲
۴	۵	۱۰۵	۱۴۲	۳۷/۲۰	۳۷/۹۹	۱۰۰/۰۰	۹۸/۹۲
۵	۵	۱۰۵	۱۴۲	۳۷/۰۰	۳۷/۹۹	۱۰۰/۷۰	۹۸/۹۲
۶	۵	۱۰۵	۱۴۲	۳۸/۸۰	۳۷/۹۹	۹۷/۰۰	۹۸/۹۲
۷	۲/۳	۹۶	۸۵	۳۷/۳۰	۳۶/۸۹	۹۷/۵۰	۹۷/۵۳
۸	۸/۶	۹۶	۸۵	۴۰/۲۰	۴۰/۱۹	۹۶/۱۰	۹۶/۶۵
۹	۲/۳	۱۱۴	۸۵	۴۱/۰۰	۴۱/۰۰	۱۰۰/۹۰	۱۰۰/۶۶
۱۰	۸/۶	۱۱۴	۸۵	۳۷/۲۰	۳۷/۷۰	۹۹/۶۰	۹۹/۷۹
۱۱	۲/۳	۹۶	۲۰۰	۳۸/۱۰	۳۷/۲۵	۱۰۴/۴۰	۱۰۳/۳۳
۱۲	۸/۶	۹۶	۲۰۰	۴۰/۵۰	۴۰/۵۵	۱۰۲/۷۰	۱۰۲/۴۶
۱۳	۲/۳	۱۱۴	۲۰۰	۴۰/۲۰	۳۹/۸۶	۱۰۴/۸۰	۱۰۴/۶۶
۱۴	۸/۶	۱۱۴	۲۰۰	۳۶/۱۰	۳۶/۵۶	۱۰۵/۶۰	۱۰۳/۷۹
۱۵	۲	۱۰۵	۱۴۲	۳۹/۶۰	۴۰/۶۱	۱۰۱/۴۰	۱۰۲/۹۲
۱۶	۸	۱۰۵	۱۴۲	۴۱/۴۰	۴۰/۶۱	۱۰۰/۰۰	۱۰۰/۴۵
۱۷	۵	۹۰	۱۴۲	۳۶/۸۰	۳۷/۴۹	۹۵/۵۰	۹۵/۶۱
۱۸	۵	۱۲۰	۱۴۲	۳۸/۰۰	۳۷/۵۶	۹۸/۵۰	۹۹/۳۶
۱۹	۵	۱۰۵	۴۵	۳۸/۴۵	۳۸/۳۲	۱۰۰/۸۰	۱۰۰/۱۶
۲۰	۵	۱۰۵	۲۴۰	۳۷/۳۵	۳۷/۶۷	۱۰۶/۸۰	۱۰۸/۴۱

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

مدل رگرسیون درجه دوم به صورت تابعی از متغیرهای مستقل (x_i) بیان شدند:

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

Y نشان‌دهنده مقدار متغیرهای وابسته، K نمایانگر تعداد متغیرهای مستقل، $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ ضرایب مدل رگرسیون و x_i, x_j متغیرهای مستقل و ε خطای احتمالی است (بزرا و همکاران، ۲۰۰۸).

عدم معنی‌داری آزمون عدم برازش^۱ و مقادیر بالای ضرایب R^2 برای یک مدل، بیانگر این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار گرفته‌اند و می‌توان از مدل برای پیش‌بینی مقادیر پاسخ استفاده نمود. بر اساس منابع بهتر است مقدار عددی ضریب تبیین R^2 برای داده‌هایی با ماهیت شیمیایی بیشتر از ۰/۸ باشد و تفاوت عددی ضرایب تبیین تطابق یافته و پیش‌بینی شده تقریباً ۰/۲ باشد (سوسا و همکاران، ۲۰۱۰).

نتایج و بحث

مدل‌سازی و بررسی مدل: بر اساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس (جدول ۳) مقدار p موجود در جدول نشان از معناداری مدل انتخابی برای هر دو متغیر می‌باشد. از طرف دیگر مناسب بودن مدل‌های پیشنهادی نیز بر اساس مقدار عدم برازش نیز تعیین شدند. مقادیر بالای ضریب تبیین R^2 و همچنین تطابق بین ضریب تبیین تطابق یافته^۲ و ضریب تبیین پیش‌بینی شده^۳ نیز بیانگر رضایت بخشی مدل‌ها می‌باشد. پس از تأیید مدل‌ها از نظر میزان دقت، تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه انجام گرفت و مدل‌های رگرسیون ریاضی آن‌ها نیز محاسبه گردید (جدول ۴).

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

p -value	F -value	درجه آزادی	مربع میانگین	جمع مربعات	منبع تغییرات
> 0.0003	۱۰/۳۸	۶	۶/۱۴	۳۵/۸۵	مدل رگرسیون
		۱۳	۰/۵۹	۷/۶۹	باقیمانده
0.0003	۰/۶۳	۸	۰/۴۸	۳/۸۶	عدم برازش Y_1
		۵	۰/۷۷	۳/۸۳	خطای خالص
		۱۹		۴۴/۵۵	Corr total
> 0.0001	۴۵/۶۳	۸	۴۶۱۴۴/۳۴	$3/692 E^* + 0.05$	مدل رگرسیون
		۱۱	۱۰۱۱/۲۴	۱۱۱۲۳/۶۳	باقیمانده
0.0191	۰/۲۹	۶	۴۷۶/۴۴	۲۸۵۸/۶۷	عدم برازش Y_2
		۵	۱۶۵۲/۹۹	۸۲۶۴/۹۷	خطای خالص
		۱۹		$3/803 E^* + 0.05$	Corr total

Y_1 : دمای تشکیل ژل، Y_2 : نقطه ذوب $E^* = 1 \times 10^{-2}$

- 1- Lack of fit
- 2- Adjusted R -squared
- 3- Predicted R -squared

محمد رضا انتصاریان بیدگلی و همکاران

جدول ۴- مدل رگرسیونی و ضرایب مقادیر R

R-Pred	R-Adj	R ²	مدل	پاسخ
۰/۵۹۰	۰/۷۶۷	۰/۸۲۷	$۳۷/۹۹+۰/۰۳۱B-۰/۱۹C-۱/۶۵AB-۰/۳۷BC+۰/۹۳A^2-۰/۱۷B^2$	Y ₁
۰/۶۸۵	۰/۸۱۹	۰/۸۸۶	$۹۸/۹۲-۰/۴۴A+۱/۱۲B+۲/۴۵C-۰/۴۵BC+۰/۸A^2-۰/۵۱B^2+۱/۹۰C^2$	Y ₂

Y₁: دمای تشکیل ژل، Y₂: نقطه ذوب

اثر شرایط مختلف استخراج بر دمای تشکیل ژل: آنالیز واریانس اثر ساده متغیرهای فرآیند نشان می‌دهد (جدول ۵) که هیچ یک از متغیرهای ورودی (A، B و C) به تنهایی تأثیری معناداری بر روی دمای تشکیل ژل آگار نداشته‌اند ($P > ۰/۰۵$). اگرچه اثر همزمان قلیا و دما (AB) اثر معنی‌داری بر دمای تشکیل ژل داشته است.

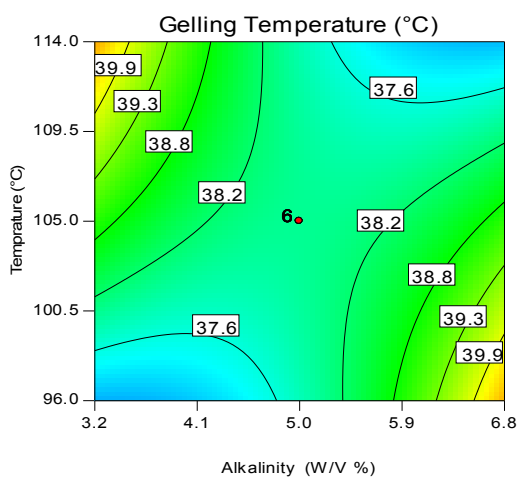
جدول ۵- آنالیز آماری فاکتورهای دخیل در مدل پاسخها

خطای استاندارد	p-value	F- value	درجه آزادی	ضریب برآورد	فاکتور	
۰/۲۱	۰/۸۸۵۳	۰/۰۲۲	۱	۰/۰۳۱	B	Y ₁
۰/۲۱	۰/۳۶۸۳	۰/۸۷	۱	-۰/۱۹	C	
۰/۲۷	۰/۰۰۰۱>	۳۶/۸۰	۱	-۱/۶۵	AB	
۰/۲۷	۰/۱۹۱۲	۱/۹۰	۱	-۰/۳۷	BC	
۰/۲۰	۰/۰۰۰۵	۲۱/۰۸	۱	۰/۹۳	A ²	
۰/۲۰	۰/۴۱۳۹	۰/۷۱	۱	-۰/۱۷	B ²	
۰/۳۶	۰/۲۵۳۷	۱/۴۴	۱	-۰/۴۴	A	Y ₂
۰/۳۶	۰/۰۰۹۷	۹/۴۲	۱	۱/۱۲	B	
۰/۳۶	۰/۰۰۰۱>	۴۵/۴۸	۱	۲/۴۵	C	
۰/۴۸	۰/۳۶۲۳	۰/۹۰	۱	-۰/۴۵	BC	
۰/۳۵	۰/۰۴۳۴	۵/۱۰	۱	۰/۸۰	A ²	
۰/۳۵	۰/۱۷۶۲	۲/۰۷	۱	-۰/۵۱	B ²	
۰/۳۵	۰/۰۰۰۲	۲۸/۶۷	۱	۱/۹۰	C ²	

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

با توجه به شرایط آزمایش، میزان دمای تشکیل ژل آگار به‌دست آمده از نمونه بومی (بدون پیش‌فرآوری) $27/9 \pm 0/17$ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد، اما با انجام عملیات پیش‌فرآوری این پاسخ بسیار افزایش یافت و دمای تشکیل ژل در محدوده $36/1$ تا $41/4$ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. بنابراین دمای تشکیل ژل آگار تولید شده با نمونه‌های تیمار یافته، در مقایسه با نمونه بدون پیش‌فرآوری از مقدار بالاتری برخوردار شده است که می‌توان ناشی از افزایش میزان متوکسیل در آگار تیمار شده (فالشاو و همکاران، ۱۹۹۸) و همچنین مرتبط با اثرات همزمان متغیرهای ورودی، به‌ویژه اثر همزمان غلظت قلیا و دما دانست. که البته با این وجود بر اساس استاندارد اتحادیه داروسازی آمریکا (USP)^۱ دمای تشکیل ژل آگار باید در محدوده بین ۳۴ تا ۴۳ درجه سانتی‌گراد باشد (لی و همکاران، ۲۰۰۸).

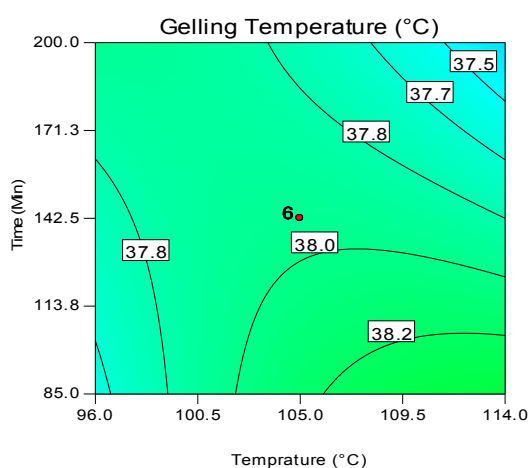
شکل ۱ اثرات همزمان دما و غلظت قلیا را بر دمای تشکیل ژل آگار نشان می‌دهند، به نحوی که در غلظت‌های کمتر از ۵ درصد با افزایش دما، دمای تشکیل ژل افزایش یافته و در غلظت‌های بالاتر از ۵ درصد با افزایش دما میزان این پاسخ نیز کاهش می‌یابد. تغییر در دمای ژلهای به‌دلیل پیش‌فرآوری با غلظت‌های متفاوت قلیا می‌تواند با وزن مولکولی و توزیع وزن مولکولی در آگار مرتبط باشد که این پارامترها به‌شدت در خواص ژلهای مؤثرند (فریل - پلگرین و مورانو، ۲۰۰۵).



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

1- United States Pharmacopeia

شکل ۲ نشان‌دهنده اثر همزمان متغیرهای دما و زمان بر دمای تشکیل ژل را نشان می‌دهد، به گونه‌ای که در ابتدای این محدوده رابطه مثبت بین این دو متغیر مفروض می‌شود، یعنی با افزایش همزمان آن‌ها دمای تشکیل ژل نیز افزایش می‌یابد که این روند تا دمای ۱۰۵ ادامه دارد، اما پس از آن با افزایش دما و زمان استخراج تا ۱۵۰ دقیقه، دمای تشکیل ژل نیز کاهش می‌یابد. پس از این زمان دوباره رابطه مثبت بین این دو متغیر ایجاد می‌گردد که منجر به افزایش دمای تشکیل ژل می‌شود. بر اساس مطالعات، پلی‌ساکاریدها حاوی باندهای هیدروژنی درون مولکولی می‌باشند که می‌توانند در اثر حرارت ملایم شکسته شده و منجر به تغییر ساختار گردند. این امر احتمالاً می‌تواند افزایش دمای تشکیل ژل در این محدوده نسبت به دمای بالاتر از ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد را توجیه نماید (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹). بر اساس مطالعات محققان سطوح بالای جانشینی متیل استر منجر به افزایش این پاسخ می‌گردد (ویلانویا و همکاران، ۲۰۱۰b)، به این مفهوم که همزمان با افزایش میزان متوکسیل، دمای تشکیل ژل نیز افزایش می‌یابد (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹)، بنابراین ممکن است با گذشت زمان بیشتر، وقوع متیلاسون منجر به افزایش دمای تشکیل ژل گردد. محققان گزارش نموده‌اند که دمای تشکیل ژل آگار استحصال از گراسیلاریا، به صورت مستقیم به میزان 6-O-methyl-D-galactose و همچنین anhydro-2-O-methyl-L-galactose 3,6- (ردری‌گیوزا و همکاران، ۲۰۰۹)، و همچنین موقعیت گروه‌های متیلاسون مربوط می‌شود (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹) که البته در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفتند.



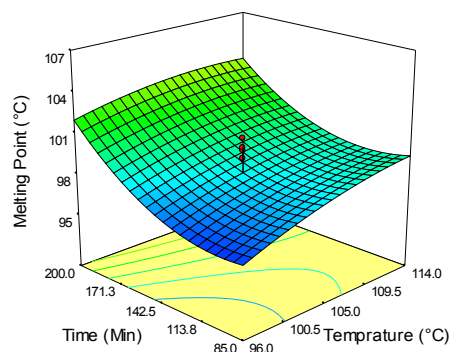
شکل ۲- اثرات همزمان دما و زمان استخراج بر دمای تشکیل ژل آگار

از مشخصات بارز آگار استحصالی از آگاروفیت‌های گراسیلاریا، وجود محدوده بالای دمای تشکیل ژل می‌باشد، که این مشخصه ممکن است آن‌ها را از به کارگیری در صنعت میکروبیولوژی به‌عنوان محیط کشت محدود نماید، چرا که در این صنعت آگاری با دمای ژله‌ای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد موردنیاز می‌باشد (ویلانیوا و همکاران، ۲۰۱۰b). بنابراین به‌منظور رفع این محدودیت نیز می‌توان طی فرآیند بهینه‌سازی مقادیر کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد را برای دمای تشکیل ژل منظور کرد.

اثر شرایط مختلف استخراج بر نقطه ذوب آگار: بر اساس نتایج (جدول ۵) از بین مؤلفه‌های خطی، دما و زمان استخراج (B و C) تأثیر معناداری بر نقطه ذوب آگار داشتند ($P < 0/05$). بر اساس F -value فاکتور زمان نیز تأثیر مثبت بیشتری را بر تعیین نقطه ذوب آگار داشته است، به نحوی که با افزایش زمان استخراج، میزان نقطه ذوب نیز افزایش یافت.

با انجام طرح آزمایشات، میزان نقطه ذوب آگار از نمونه بومی (بدون پیش‌فرآوری) $87/4 \pm 0/5$ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد، اما با وجود پیش‌فرآوری نقطه ذوب آگار بسیار افزایش یافت و در محدوده ۹۵/۵ تا $106/8$ درجه سانتی‌گراد قرار داشت. افزایش نقطه ذوب آگار تیمار شده می‌تواند صرف‌نظر از متغیرهای ورودی و شرایط استخراج ناشی از وقوع متیلاسیون باشد (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹). مطابق با استاندارد اتحادیه داروسازی آمریکا آگار استخراج شده نباید در دمای کمتر از ۸۵ درجه سانتی‌گراد ذوب شود (اردیونا- روجاز و همکاران، ۲۰۰۸) که نقطه ذوب آگار این‌گونه نیز با کسب این استاندارد، نمایان‌گر کاربردهای ممکن آن در صنعت غذا و دارو، خصوصاً برای فرآورده‌های نیازمند به فرآیند استریلیزاسیون می‌باشد (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹).

بر همکنش مثبت میان زمان و دمای استخراج بر نقطه ذوب آگار در شکل ۳ مشخص شده است. در واقع همزمان با افزایش دما و زمان استخراج، آگار استحصالی در دماهای بالاتر ذوب می‌گردد و رابطه مثبت بین این دو متغیر ایجاد می‌گردد. با توجه به شیب گراف نیز می‌توان دریافت در این همزمانی، تأثیر زمان استخراج بیشتر می‌باشد. این رویداد را می‌توان ناشی از افزایش وزن مولکولی و همچنین وقوع بیشتر متیلاسیون در این محدوده دانست چرا که هر چه میزان وزن مولکولی بالاتر باشد، احتمال تشکیل تعاملات پایدارتر درون توالی ژلی بیشتر می‌باشد که نتیجتاً منجر به افزایش نقطه ذوب می‌گردد (ردری‌گیوزا و همکاران، ۲۰۰۹) از طرفی جانشینی و تعویض گروه‌های متیل استر بر خواص ژلی آگار مؤثر هستند، چرا که متیلاسیون طبیعی قادر به افزایش دمای تشکیل ژل و همچنین نقطه ذوب آن می‌باشد (فالشاو و همکاران، ۱۹۹۸).



شکل ۳- اثرات همزمان دما و زمان استخراج بر نقطه ذوب آگار

بر اساس گزارش‌ها، نقطه ذوب آگار رابطه مثبت با میزان اسید پیروات دارد (کومار و فوتدار، ۲۰۰۹) و علاوه بر آن نیز به توزیع وزن مولکولی آگار نیز وابسته می‌باشد (منا و همکاران، ۲۰۰۸). پلی‌ساکاریدهای حاصل از گراسیلا یا از واحدهای متناوب β -D-galactopyranose-(G) و 3,6-anhydro-a-L-galactopyranose (LA) تشکیل شده است و این واحدها می‌توانند با گروه‌های استرسولفات و یا متیل جایگزین شوند (ماسیل و همکاران، ۲۰۰۸). در فرآیندهای استخراج، نظم ساختاری آگار ممکن است همواره حفظ شود و یا تغییراتی در بخش‌هایی از استرهای سولفات که در بخش‌هایی از بقایای گالاکتوز مثل G-2، G-4، G-6 و LA-2 می‌باشد، رخ دهد (Li et al., 2008). چنانچه سطوح بالای متیلاسیون به تنهایی روی β -D-galactopyranosyl (G-6) و یا فقط روی LA-2(3,6-anhydro-a-L-galactopyranosyl) رخ دهد، منجر به افزایش نقطه ذوب آگار می‌گردد که حتی تا مرز نقطه جوش آب در آگارهایی که قدرت ژل بالایی دارند، می‌رسد که مانند آن در ژل‌های آگار استحصالی *Curdia crassa* و *Pterocladia lucida* مطالعه شده است. ولی چنانچه متیلاسیون هم روی β -D-galactopyranosyl (G-6) و هم روی LA-2 (3,6-anhydro-a-L-galactopyranosyl) رخ دهد، نقطه ذوب آگار در ژل‌های پایدار، به مقدار قابل ملاحظه‌ای، فراتر از نقطه جوش آب افزایش می‌یابد که نظیر آن در ژل‌های آگار استحصالی *Curdia coriacea* و *Curdia obesa* مطالعه شده است (فالشو و همکاران، ۱۹۹۸). بر اساس پژوهش‌های انجام شده میزان نقطه ذوب به متغیرهایی چون موقعیت و میزان متیلاسیون و همچنین پیروات و سولفات و بقایای گروه قند، وزن مولکولی و میزان حضور گالاکتوز ۶- سولفات و ۳،۶ انیدرو L گالاکتوز بستگی دارد (کاپراین و همکاران، ۱۹۹۴).

انتخاب تیمار بهینه و آزمون تأییدی: برای انتخاب تیمار بهینه، از تکنیک بهینه‌سازی عددی استفاده شد. تنظیمات اعمال شده در این روش شامل کمینه متغیر غلظت قلیا با درجه اهمیت ۵ بوده و برای سایر متغیرها نیز در همان محدوده آزمایش تعریف شدند. در پایان غلظت قلیا ۳/۲ درصد، دمای استخراج ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۲۰۰ دقیقه به دست آمد. مقادیر واقعی و پیش‌بینی مدل و نتایج حاصل از مقایسه میانگین آن‌ها در جدول ۶ نشان داده شده است. با توجه به این که مقدار معنی‌داری مشاهده شده از عدد (۰/۰۵) بزرگ‌تر است، بنابراین تفاوت معنی‌داری بین مقادیر واقعی با مقادیر حاصل از پیش‌بینی مدل در مورد هیچ پارامتری وجود نداشت و نشان‌دهنده مطابقت مدل با مقادیر واقعی می‌باشد.

جدول ۶- مقایسه نتایج پیش‌بینی مدل و مقادیر واقعی

پاسخ	پیش‌بینی مدل	مقادیر واقعی	p-value
دمای تشکیل ژل	۳۹/۳۳	۳۸/۱۶±۰/۴۴	۰/۱۱۹
نقطه ذوب ژل	۱۰۴/۶۷	۱۰۲/۶±۰/۸۴	۰/۱۳۴

میانگین ± اشتباه معیار (n=۳)

منابع

- Bezerraa, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, S.L. and Escaleira, L.A. 2008. Review: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76: 965-977.
- Falshaw, R., Furneaux, R.H. and Stevenson, D.E. 1998. Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* 308: 107-115.
- Freile-Pelegrín, Y. and Murano, E. 2005. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatan Peninsula. *Bioresour. Technol.* 96: 295-302.
- Freile-Pelegrín, Y. and Robledo, D. 1997. Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan Mexico. *J. Appl. Phycol.* 9: 533-539.
- Kapraun, D.F., Ganzon-Fortes, E., Bird, K.T., T4rono, G. and Breden, C. 1994. Karyology and agar analysis of the agarophyte *Gelidiella acerosa* (Forsskal) Feldmann *et* Hamel from the Philippines. *J. Appl. Phycol.* 6: 545-550.
- Kumar, V. and Fotedar, R. 2009. Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, and Kraft, 1994). *Carbohydr. Polym.* 78: 813-819.
- Li, H., Yu, X., Jin, Y. and Zhang, W., Liu. 2008. Development of an ecofriendly agar extraction technique from the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis*. *Bioresour. Technol.* 99: 3301-3305.

8. Maciel, J.S., Chaves, L.C., Souza, B.W.S., Teixeira, D.I.A., Freitas, A.L.P., Feitosa, J.P.A. and de Paula, R.C.M. 2008. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydr. Polym.* 71: 559-565.
9. Matinfar, M., Rafiee, F., Nejatkhah Manavi, P., Joon Lee, I. and Hong, Y.Ki. 2013. Optimal conditions for tissue growth and branch induction of *Gracilariopsis persica*. *J. Fish. Sci.* 12(1): 24-33.
10. Meena, R., Kamalesh, P., Ganesan, M. and Siddhanta, A.K. 2008. Superior quality agar from *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) collect from the Gulf of Mannar. India. *J. Appl. Phycol.* 20: 397-402.
11. Khuri, A.I. and Mukhopadhyay, S. 2010. "Response Surf Methodology" In: Wegman, E.J., Said, Y.H. and Scott, D.W., (eds) *Wiley Interdisciplinary Reviews-Computational Statistics*, Vol. 2(2). New Jersey, Wiley, Hoboken. Pp: 128-149.
12. Orduña-Rojas, J., Suárez-Castro, R., López-Alvaréz, E.S., Ríosmena-Rodríguez, R., Pacheco-Ruiz, I., Zertuche-González, J.A. and Meling-López, A.E. 2008. Influence of alkali treatment on agar from *Gracilariopsis longissima* and *Gracilaria vermiculophylla* from the Gulf of California, Mexico. *Ciencias Marinas.* 34(4): 503-511.
13. Pereira-Pacheco, F., Robledo, D., Rodríguez-Carvajal, L. and Freile Pelegrín. 2007. Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from Yucatan, Mexico. *Bioresour. Technol.* 98: 1278-1284.
14. Rodríguez, M.C., Matulewicz, M.C., Nosedá, M.D., Ducatti, D.R.B. and Leonardi, P.L. 2009. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina-Content, structure and physical properties. *Bioresour. Technol.* 100: 1435-1441.
15. Sousa, A.M.M., Alves, V.D., Morais, S., Delerue-Matos, C. and Gonçalves, M.P. 2010. Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: Evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 101: 3258-3267.
16. Villanueva, R.D., Romero, J.B., Ragasa, A.L.R. and Montaña, M.N.E. 2010b. Agar from the red seaweed, *Laurencia flexilis* (Ceramiales, Rhodophyta) from northern Philippines. *Phycol. Res.* 58: 151-156.

