

Optimization of Pectin Xtraction from Unripened Grape Pomace Using Citric Acid and Investigation of Its Physicochemical Properties

MEHDI REZAEI¹, FARAMARZ KHODAIYAN^{1*}, ZEINAB MOUSAVI¹, SEYED SAEID HOSSEINI¹, MILAD KAZEMI¹

1. Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering & Technology, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Feb. 13, 2020- Revised: Feb. 7, 2021- Accepted: Sep. 19, 2020)

ABSTRACT

In this study, unripened grape pomace as a valuable source for pectin extraction was investigated using acidic extraction method. For this purpose, Box-Behnken design with four independent variables in three levels (Time (30-90 min), Temperature (70-90°C), pH (1.5-3.0) and liquid to solid ratio (20-40 v/w)) was used to optimize the pectin extraction yield that the highest pectin extraction yield in the optimum conditions (time of 85 min, the temperature of 90°C, pH of 1.5 and liquid to solid ratio of 20 (v/w)) was $26.1 \pm 1.0\%$. The results showed that unripened grape pomace pectin had degree of esterification of 51.6%, galacturonic acid content of 66.1%, emulsifying activity of 57.2%, and also showed favorable emulsion stability. The FT-IR spectrum confirmed the presence of esterified poly galacturonic acid structure in pectin sample.

Keywords: Unripe grape pomace; Optimization; Acidic extraction; Physicochemical properties

بهینه‌سازی استخراج پکتین از تفاله غوره با استفاده از اسید سیتریک و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن

مهدی رضائی^۱، فرامرز خدائیان^{۱*}، زینب موسوی^۱، سید سعید حسینی^۱، میلاد کاظمی^۱

۱. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۴ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۶/۲۹)

چکیده

در این پژوهش، تفاله غوره به‌عنوان یک منبع ارزشمند جهت تولید پکتین با استفاده از روش استخراج اسیدی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از طرح باکس-بنکن با ۴ متغیر مستقل در ۳ سطح (زمان ۶۰ تا ۹۰ دقیقه)، دما (۷۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس)، pH (۱/۵ تا ۳/۰) و نسبت مایع به جامد (۲۰ تا ۴۰ حجمی/وزنی)) برای بهینه‌سازی راندمان تولید پکتین استفاده شد که بالاترین راندمان تولید در شرایط بهینه (زمان ۸۵ دقیقه، دمای ۹۰ درجه سلسیوس، pH برابر با ۱/۵ و نسبت مایع به جامد ۲۰ (حجمی/وزنی)) برابر با ۱/۰ ± ۲۶/۱ درصد بود. نتایج نشان داد که پکتین تفاله غوره دارای درجه استری برابر با ۵۱/۶ درصد، محتوای گالاکتورونیک اسید برابر با ۶۶/۰ درصد، فعالیت امولسیفایری ۵۷/۲ درصد بوده و همچنین پایداری امولسیون مطلوبی از خود نشان داد. طیف FT-IR حضور پکتین غنی از زنجیره گالاکتورونیک اسید استری شده را به اثبات رساند.

واژه‌های کلیدی: تفاله غوره؛ بهینه‌سازی؛ استخراج اسیدی؛ خصوصیات فیزیکوشیمیایی

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera* L.) بر اساس هکتار کشت شده و ارزش اقتصادی، به‌عنوان یکی از محصولات عمده میوه در جهان محسوب می‌شود. به‌گفته سازمان خواربار و کشاورزی (فائو)^۱، ۷۵۸۶۶ کیلومتر مربع از جهان به انگور اختصاص داده شده است (Karabiyikli & Öncül, 2016). به‌گزارش فائو، ایران یکی از ده کشور برتر تولید کننده انگور در جهان است که در طی سال ۲۰۱۰، ۲۲۵۵۶۷۰ تن انگور تولید کرده است (FAO, 2010). مقدار زیادی از انگور به‌عنوان انگور نارس (غوره) برای تولید آبغوره برداشت می‌شود (Shojaee-Aliabadi et al., 2013).

حجم زیادی از غوره را تفاله تشکیل می‌دهد که پس از آب‌گیری دور ریخته می‌شود درحالی‌که منبع با ارزشی از لیپید، پروتئین، آنتی‌اکسیدان‌ها و کربوهیدرات‌ها می‌باشد (Shojaee-Aliabadi et al., 2013; Öncül & Karabiyikli, 2015). بنابراین استفاده از آن برای تولید ترکیبات مختلف مانند پکتین نه تنها سبب تولید یک ماده با ارزش از ضایعات با کمترین هزینه می‌شود، بلکه منجر به کاهش آلودگی‌های زیستی نیز می‌گردد (Kazemi et al., 2019d).

پکتین، پلی‌ساکارید پیچیده‌ای است که در حد فاصل بین دیواره‌های سلولی گیاهان مختلف وجود دارد و حدود ۳۵ درصد

از دیواره سلولی گیاهان را تشکیل می‌دهد (Mohnen, 2008; Maran et al., 2014). ساختار اصلی آن شامل واحدهای α-۱ و ۴-D-گالاکتورونیک اسید است که قندهای خنثی به‌عنوان زنجیره‌های جانبی به آن متصل هستند. با این وجود، این کربوهیدرات متشکل از پلی‌ساکاریدهای پیچیده متعددی است که هموگالاکتورونان و رامنوگالاکتورونان نوع ۱ مهم‌ترین آن‌ها هستند (Kazemi et al., 2019a). پکتین از نظر درجه استریفیکاسیون به دو گروه پکتین با درجه استریفیکاسیون بالاتر از ۵۰ درصد و پکتین با درجه استریفیکاسیون کمتر از ۵۰ درصد تقسیم می‌شود. این اشکال مختلف پکتین دارای چندین کاربرد هستند. پکتین با متوکسیل بالا می‌تواند به‌عنوان عامل ژل‌کننده، ثبات‌دهنده، امولسیفایر و غلیظ‌کننده در صنعت غذا برای تولید مرباها و ژله‌ها استفاده شود، درحالی‌که پکتین با متوکسیل پایین می‌تواند به‌عنوان جایگزین چربی در اسپردها^۲، بستنی، آماده‌سازی میوه برای ماست، لعاب نانوائی برگشت‌پذیر با حرارت، محصولات گوشتی امولسیفای شده یا محصولات کم‌کالری مانند نوشیدنی‌های گازدار رژیمی استفاده شود (Marić et al., 2018). پکتین در صنعت داروسازی، به‌منظور کاهش کلسترول خون و تسکین درد (Liu et al., 2010)، پیشگیری از بیماری‌های قلبی و سنگ صفرا (Bagherian et al., 2011; Hosseini et al., 2011) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

* نویسنده مسئول: Khodaiyan@ut.ac.ir

۱. Food and Agriculture Organization

۲. Spreads

مواد

غوره یا انگور نارس از یک تهیه کننده محلی در شهرستان خلخال تهیه گردید. تمامی مواد و معرفها از شرکت سیگما آمریکا و روغن آفتابگردان از شرکت اوپلا ایران خریداری شد.

آماده سازی پودر تفاله غوره

پس از آبغوره گیری، تفاله غوره (پوست و پالپ) در یک آون با دمای ۴۵ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. سپس تفاله خشک شده با استفاده از آسیاب پودر شد و از مش شماره ۴۰ جهت جداسازی دانه های درشت عبور داده شد. پس از الک کردن، پودر به دست آمده درون ظروف پلاستیکی در محیطی خشک و دور از نور آفتاب نگهداری شد.

استخراج پکتین

به منظور استخراج پکتین از تفاله ی غوره به روش اسیدی، پس از انجام پیش آزمایش برای رسیدن به بازده نسبتا مطلوبی از استخراج پکتین و همچنین استفاده از پژوهش ها و مطالعات قبلی انجام شده، فاکتورهای دما (۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سلسیوس)، زمان (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه)، pH (۱/۵۰، ۲/۲۵ و ۳/۰۰) و نسبت مایع به جامد (۲۰، ۳۰ و ۴۰ حجمی/وزنی) جهت بهینه سازی استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح باکس - بنکن انتخاب شدند. بدین منظور ۵ گرم از پودر تفاله غوره با محلول اسید سیتریک در نسبت های مشخص در یک بشر مخلوط گردید. سپس بشر محتوی پودر و اسید درون حمام آب داغ که قبلا دمای آن توسط همزن مغناطیسی مجهز به گرم کن، ثابت شده بود قرار گرفت و به منظور انجام فرآیند استخراج در دما و زمان مشخص نگهداری گردید. پس از انجام فرآیند استخراج، برای جداسازی تفاله باقیمانده از سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ ×g به مدت ۲۰ دقیقه) استفاده شد. سپس، محلول بدست آمده در نسبتی برابر با اتانول مخلوط گردید و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. در نهایت، پکتین جمع شده پس از ۲ بار شستشو با اتانول ۹۶ درصد، در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و به مدت ۱۸ ساعت خشک گردید. درصد راندمان تولید پکتین با توجه به رابطه ۱ (Kazemi *et al.*, 2019a) محاسبه گردید:

(رابطه ۱)

$$\text{وزن خشک پکتین} \times 100 = \frac{\text{وزن پودر خشک تفاله غوره}}{\text{وزن پودر خشک تفاله غوره}} \times 100$$

اندازه گیری درجه استریفیکاسیون

درجه استریفیکاسیون نمونه ها با روش تیتراسیون اندازه گیری شد

(*et al.*, 2016a). همچنین این پلی ساکارید در انکپسولاسیون انواع داروها کاربرد دارد (Liu *et al.*, 2007) و ممکن است فعالیت های ضد سرطانی داشته باشد (Willats *et al.*, 2006). علاوه بر این، این پلی ساکارید می تواند در صنایع آرایشی برای محافظت از پوست در برابر اشعه ماوراء بنفش استفاده شود (Shao *et al.*, 2018). پکتین تجاری اغلب از بقایای استخراج آبمیوه (تفاله سیب یا پوست مرکبات) یا قند (پالپ چغندر قند) تولید می شود (Jafari *et al.*, 2017). با این وجود، به دلیل تقاضای زیاد پکتین در بازار جهانی (بیش از ۳۰،۰۰۰ تن در سال)، تاکنون این پلی ساکارید از منابع دیگر (به عنوان منابع غیر تجاری پکتین) مانند پوست بادمجان (Kazemi *et al.*, 2019c)، پوست نارنج (Hosseini *et al.*, 2019)، پوست موز (Qiu *et al.*, 2010)، پوست سبز پسته (Kazemi *et al.*, 2019a) و غیره نیز استخراج شده است.

در روش استخراج سنتی، پکتین با استفاده از یک اسید معدنی رقیق (اسید کلریدریک، اسید نیتریک و اسید سولفوریک) استخراج شده و از طریق رسوب با اتانول بازیافت می گردد. به طور کلی، اسیدهای معدنی قیمت پایین تری نسبت به اسیدهای آلی دارند. با این حال، بزرگترین اشکال این اسیدهای معدنی، سمیت آن ها و اثرات مخرب بر محیط زیست است. بنابراین، مشکلات مذکور را می توان با اسید آلی مانند اسید سیتریک حل کرد (Jafari *et al.*, 2017; Colodel *et al.*, 2019). همچنین تحقیقاتی که هدف بررسی تاثیر فاکتورهای مختلف و اثر متقابل آن ها روی یک یا چند پاسخ باشد، بهینه سازی فرآیند، کاری بسیار طولانی و خسته کننده خواهد بود. روش سطح پاسخ^۱ (RSM)، به عنوان ای از تکنیک های آماری و ریاضی، با کاهش تعداد آزمایشات و در نتیجه کاهش هزینه و زمان، روشی کارآمد برای رسیدن به هدف فوق می باشد (Bitaraf *et al.*, 2012; Swamy & Muthukumarappan, 2017).

با توجه به موارد گفته شده در بالا و اهمیت استفاده از ضایعات برای تولید پکتین به منظور کاهش هزینه و همچنین آلودگی های محیط زیستی، هدف از این تحقیق بهینه سازی استخراج پکتین از تفاله غوره به روش استخراج اسیدی به منظور دستیابی به بالاترین راندمان تولید و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، عملکردی و ساختاری پکتین استحصال می - باشد.

مواد و روش ها

نگهداری می‌شود، اندازه‌گیری گردید (Hosseini et al., 2019). به طور خلاصه، یک گرم از پکتین تفاله غوره در داخل یک لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری توزین شده و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به آن افزوده شد. سپس، مخلوط به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. در مرحله ی بعد، مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه و در دور ۲۳۰۰ سانتریفیوژ گردید. در گام بعدی، رومان (سوپرناتانت) دور ریخته شده و به مدت ۱۵ دقیقه لوله آزمایش به صورت وارونه روی کاغذ صافی قرار داده شد تا آب اضافی آن به طور کامل خارج گردد. محتویات باقیمانده پس از توزین، از وزن اولیه لوله آزمایش و وزن اولیه پکتین (۱ گرم) کم گردید. عدد باقی مانده وزن مقدار آب جذب شده توسط یک گرم پکتین را نشان می‌دهد. روش اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری روغن نیز مشابه روش بالا می‌باشد با این تفاوت که به جای ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه، از روغن خوراکی آفتابگردان استفاده گردید. باید به این نکته توجه شود که چگالی روغن خوراکی متفاوت از آب بوده و حتماً از این نظر مورد توجه قرار گیرد (چگالی روغن استفاده شده: ۰/۹ گرم بر میلی لیتر). عددی که به دست خواهد آمد نشان‌دهنده مقدار روغنی است که توسط یک گرم پکتین نگهداری می‌شود.

خصوصیات امولسیفایری

در این تحقیق، از روش Dalev & Simeonova (1995)، با کمی تغییر برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیفایری^۳ (EA) و پایداری امولسیون^۴ (ES) استفاده شد. بدین منظور ۵ میلی‌لیتر روغن آفتاب گردان را با ۵ میلی‌لیتر محلول پکتین ۰/۵ درصد حجمی/وزنی مخلوط کرده و ۰/۲ درصد سدیم آزید برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها به آن اضافه شد. در مرحله بعد نمونه با اولتراسوند در توان ۱۰۰ وات و به مدت ۱۰ دقیقه هموزن گردید. سپس امولسیون ایجاد شده برای ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فعالیت امولسیفایری با توجه به معادله زیر محاسبه می‌شود:

(رابطه ۳)

$$100 \times \frac{\text{حجم لایه امولسیون شده}}{\text{حجم کل محلول}} = \text{فعالیت امولسیونی (درصد)}$$

در این مطالعه، برای اندازه‌گیری پایداری امولسیون، نمونه‌ها به مانند روش بالا تهیه شده و سپس پایداری امولسیون‌ها بر اساس معادله زیر در دماهای ۴ و ۲۳ درجه سلسیوس پس از ۱ و ۳۰ روز اندازه‌گیری شد:

(رابطه ۴)

$$100 \times \frac{\text{حجم لایه امولسیون باقی مانده}}{\text{حجم لایه امولسیون اولیه}} = \text{پایداری امولسیون (درصد)}$$

(Kazemi et al., 2019d). 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 (حدوداً پس از یک ساعت) به هم زده شد. سپس، ۴ قطره فنول فتالین به محلول اضافه شده و با سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار تا ظهور رنگ صورتی کمرنگ تیتیر گردید (حجم اولیه). در مرحله بعد، ۱۰ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی به هم زده شد. ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ مولار به محلول استحصالی اضافه و تا از بین رفتن کامل رنگ صورتی به هم زده شد و سپس هیدروکلریک‌اسید باقی مانده با سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار تا ظهور رنگ صورتی تیتیر شد (حجم ثانویه). درجه استریفیکاسیون با توجه به معادله زیر محاسبه گردید:

(رابطه ۲)

$$100 \times \frac{\text{حجم ثانویه}}{\text{حجم ثانویه} + \text{حجم اولیه}} = \text{درجه استریفیکاسیون (درصد)}$$

اندازه‌گیری محتوای گالاکتورونیک اسید

در این تحقیق برای اندازه‌گیری محتوای گالاکتورونیک اسید موجود در پکتین استخراج شده در نقاط بهینه از روش متا هیدروکسی دی فنیل استفاده شد (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). به لوله‌های آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول آبی پکتین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۶ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک/تتراپورات اضافه شد. سپس لوله‌های آزمایش در حمام آب-یخ به منظور سرد شدن قرار گرفت. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها، لوله‌ها به مدت ۶ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. پس از سرد شدن در حمام آب-یخ، ۱ میلی‌لیتر معرف به هر یک از لوله‌های آزمایش افزوده و سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Spectrum SP-UV500DB, Germany) 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 گالاکتورونیک‌اسید در آب مقطر دیونیزه، رقت‌های مختلف تهیه شده (۰-۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) و جذب هر یک از آن‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد.

ظرفیت نگهداری آب^۱ و ظرفیت نگهداری روغن^۲

در این روش مقدار گرم آب یا روغنی که توسط یک گرم پکتین

پکتین (پاسخ) استفاده شد. در جدول ۲ تمامی ۲۷ آزمون و مقادیر پیش بینی شده و تجربی موجود است. بهینه سازی شرایط و معادله بدست آمده (رابطه ۶) نشان داد که مقدار پیش بینی شده برای راندمان استخراج در نقطه بهینه استخراج (زمان ۸۵ دقیقه، دما ۹۰ درجه سلسیوس، pH برابر با ۱/۵ و نسبت مایع به جامد ۲۰ حجمی/وزنی) برابر ۲۶/۲ درصد بوده است که این مقدار پس از سه بار تکرار در نقطه مذکور و نزدیکی میزان تجربی بدست آمده (۱/۰ ± ۲۶/۱) با مقدار پیش بینی شده تایید شد.

نتایج آنالیز واریانس مربوط به استخراج پکتین در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود، از لحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار بوده ($p < 0.05$) و با توجه به آزمون عدم برازش (برابر با ۰/۰۸۵ بوده و بی معنی می باشد) در جدول ۳ می توان بیان داشت که مدل درجه دوم چند جمله ای پیشنهادی برای استخراج پکتین متناسب بوده است. برای توضیح بیشتر باید بیان شود که از نظر معنی دار و غیر معنی دار بودن هر یک از فاکتورها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) می توان بیان داشت که تاثیر دما در حالت خطی و درجه دوم و همچنین در برهمکنش با pH معنی دار می باشد. تاثیر زمان در حالت خطی و درجه دوم و همچنین در برهمکنش با pH و نسبت مایع به جامد معنی دار می باشد. تاثیر pH در حالت خطی و درجه دوم و در برهمکنش با زمان و دما و نسبت مایع به جامد معنی دار می باشد. تاثیر نسبت مایع به جامد در حالت خطی و درجه دوم بی معنی بوده و در برهمکنش با زمان و pH معنی دار می باشد. همچنین ضریب تبیین محاسبه شده (۹۹/۶۷ درصد) نشان داد که تنها ۰/۳۳ داده ها با مدل پیشنهادی قابل توصیف نمی باشد. همچنین ضریب تبیین تعدیل شده (۹۹/۲۸ درصد) برازش خوب مدل را تایید کرد.

مدل به دست آمده برای پیش بینی شرایط استخراج پکتین از تفاله غوره مطابق زیر بوده است:

(رابطه ۶)

$$\text{Yield (\%)} = -63.5 + 0.3633X_1 + 2.853X_2 - 43.60X_3 - 0.047X_4 - 0.001611X_1^2 - 0.01350X_2^2 + 10.222X_3^2 + 0.00350X_4^2 + 0.00033X_1 X_2 - 0.0489X_1 X_3 - 0.00233X_1 X_4 - 0.1867X_2 X_3 - 0.00300X_2 X_4 + 0.1067X_3 X_4$$

اثر شرایط استخراج روی راندمان پکتین

شکل ۱ اثر شرایط مختلف استخراج بر روی راندمان پکتین را نشان می دهد. یکی از فاکتورهای مهم در استخراج پکتین فاکتور pH است. با توجه به شکل ۱ (الف، ج و د) با کاهش pH میزان راندمان تولید پکتین افزایش یافته است به طوری که بالاترین میزان تولید پکتین در پایین ترین pH بوده است. این مشاهده می تواند به این دلیل باشد که حلال استخراج (آب) با اسیدیته بالا

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی

برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی پکتین از روش Chaouch *et al.* (2015) استفاده گردید. یک میلی لیتر از محلول پکتین (غلظت ۵۰-۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به ۴ میلی لیتر از محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه گردید. مخلوط آماده شده با استفاده از ورتکس به شدت هم زده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و محلی تاریک نگهداری گردید. در نهایت، جذب نمونه ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. برای مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی پکتین از محلول آسکوربیک اسید استفاده شد. به منظور دست یابی به درصد مهار رادیکال های DPPH، از رابطه زیر استفاده گردید:

(رابطه ۵)

$$\left[1 - \left(\frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب نمونه کنترل}} \right) \right] \times 100$$

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (درصد)

بررسی طیف سنجی تبدیل فوریه (FT-IR)

در این پژوهش، طیف FT-IR پکتین بدست آمده در شرایط بهینه استخراج، با دقت ۴ بر سانتی متر و بوسیله یک اسپکترومتر Bruker FT-IR Tensor 27، و با استفاده از روش دیسک پتاسیم برماید در دامنه ۴۰۰۰ تا ۶۰۰ بر سانتی متر رسم گردید.

آنالیز آماری

جهت بهینه سازی اثر شرایط استخراج اسیدی (pH، دما، زمان و نسبت مایع به جامد) از روش سطح پاسخ و طرح باکس-بنکن با چهار متغیر در سه سطح استفاده شد. سطوح و مقادیر واقعی متغیرهای مستقل مربوط به روش استخراج اسیدی در جدول ۱ آمده است. همچنین تمامی اشکال با استفاده از Excel 2013 و Design-Expert 7.0.0 ترسیم شدند.

جدول ۱- سطوح و مقادیر متغیرهای مستقل

متغیرها	کد و مقادیر واقعی متغیرها		
	-۱	۰	+۱
زمان (دقیقه)	۳۰	۶۰	۹۰
دما (درجه سلسیوس)	۷۰	۸۰	۹۰
pH	۱/۵۰	۲/۲۵	۳/۰۰
نسبت مایع به جامد	۲۰	۳۰	۴۰
			X_1
			X_2
			X_3
			X_4

نتایج و بحث

بهینه سازی و آنالیز آماری

در این پژوهش از طرح باکس-بنکن برای بهینه سازی متغیرهای مستقل مختلف و بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر بازده تولید

سبب هیدرولیز پکتین‌های غیر محلول و تبدیل آن‌ها به پکتین محلول شده و در نتیجه راندمان استخراج افزایش می‌یابد. گزارشات Hosseini et al. (2016b) بوده است. این نتیجه همچنین مشابه با (Maran et al., 2013).

جدول ۲- داده های تجربی و پیش بینی شده برای استخراج پکتین بر اساس طرح باکس- بنکن

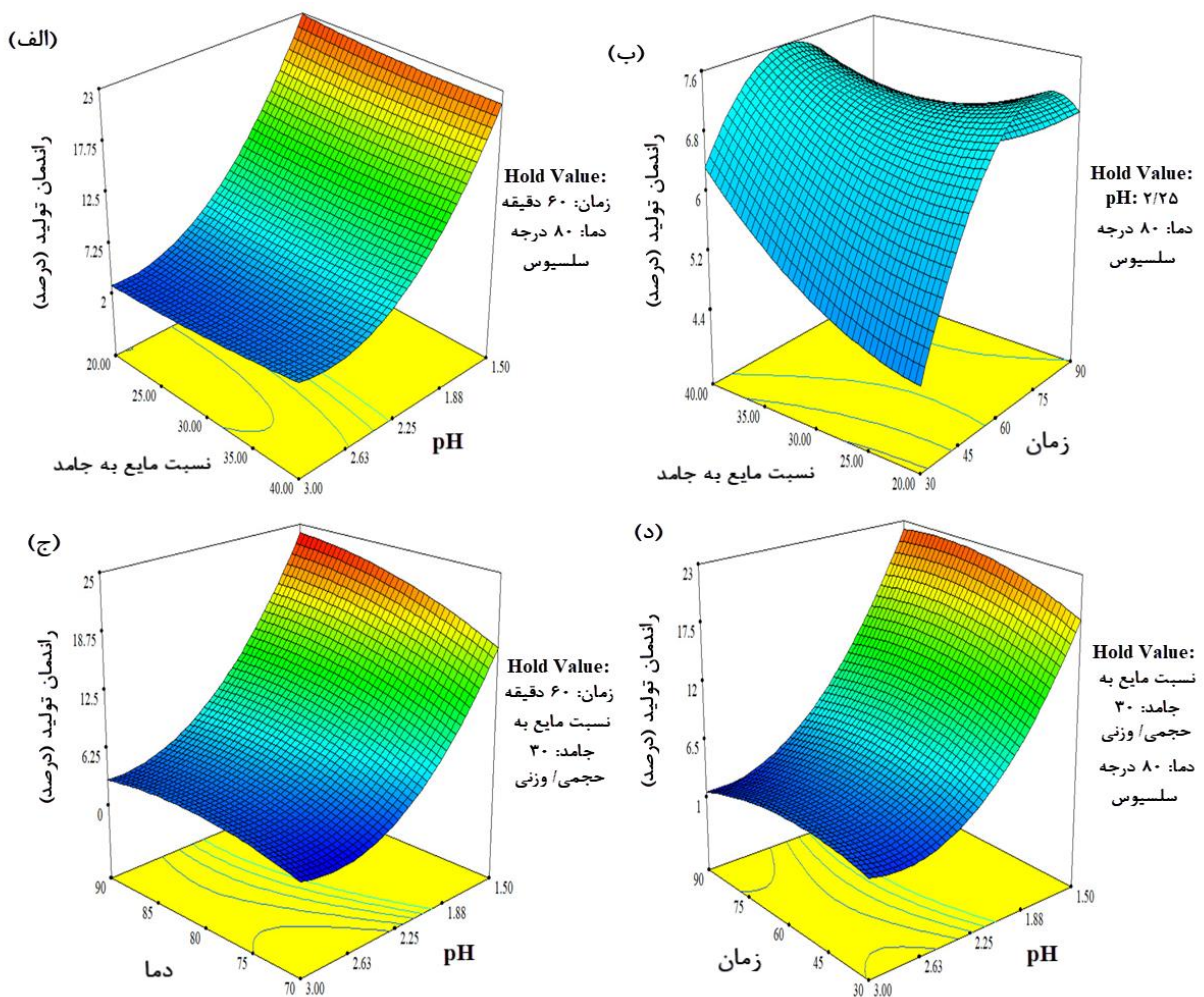
تیمار	متغیر های مستقل				پاسخ (درصد بازده استخراج)	
	X ₁ (زمان)	X ₂ (دما)	X ₃ (pH)	X ₄ (نسبت LS)	تجربی	پیش بینی شده
۱	۳۰	۷۰	۲/۲۵	۳۰	۲/۴	۱/۷
۲	۹۰	۷۰	۲/۲۵	۳۰	۳/۰	۲/۵
۳	۳۰	۹۰	۲/۲۵	۳۰	۵/۲	۵/۶
۴	۹۰	۹۰	۲/۲۵	۳۰	۶/۲	۶/۸
۵	۶۰	۸۰	۱/۵۰	۲۰	۲۳/۴	۲۲/۸
۶	۶۰	۸۰	۳/۰۰	۲۰	۳/۰	۲/۸
۷	۶۰	۸۰	۱/۵۰	۴۰	۲۱/۶	۲۱/۷
۸	۶۰	۸۰	۳/۰۰	۴۰	۴/۴	۴/۹
۹	۳۰	۸۰	۲/۲۵	۲۰	۴/۰	۴/۴
۱۰	۹۰	۸۰	۲/۲۵	۲۰	۶/۲	۶/۸
۱۱	۳۰	۸۰	۲/۲۵	۴۰	۷/۰	۶/۳
۱۲	۹۰	۸۰	۲/۲۵	۴۰	۶/۴	۵/۹
۱۳	۶۰	۷۰	۱/۵۰	۳۰	۱۷/۰	۱۷/۱
۱۴	۶۰	۹۰	۱/۵۰	۳۰	۲۴/۴	۲۴/۰
۱۵	۶۰	۷۰	۳/۰۰	۳۰	۱/۲	۱/۵
۱۶	۶۰	۹۰	۳/۰۰	۳۰	۳/۰	۲/۸
۱۷	۳۰	۸۰	۱/۵۰	۳۰	۱۸/۴	۱۸/۹
۱۸	۹۰	۸۰	۱/۵۰	۳۰	۲۲/۰	۲۲/۱
۱۹	۳۰	۸۰	۳/۰۰	۳۰	۲/۸	۲/۷
۲۰	۹۰	۸۰	۳/۰۰	۳۰	۲/۰	۱/۵
۲۱	۶۰	۷۰	۲/۲۵	۲۰	۳/۴	۳/۴
۲۲	۶۰	۹۰	۲/۲۵	۲۰	۸/۶	۸/۱
۲۳	۶۰	۷۰	۲/۲۵	۴۰	۴/۰	۴/۵
۲۴	۶۰	۹۰	۲/۲۵	۴۰	۸/۰	۷/۹
۲۵	۶۰	۸۰	۲/۲۵	۳۰	۷/۰	۷/۰
۲۶	۶۰	۸۰	۲/۲۵	۳۰	۷/۲	۷/۰
۲۷	۶۰	۸۰	۲/۲۵	۳۰	۶/۸	۷/۰

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس مربوط به راندمان استخراج پکتین

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش p
مدل	۱۴	۱۳۶۸/۹۱	۹۷/۷۸	۲۵۸/۸۳	۰/۰۰۰
خطی	۴	۱۰۶۸/۹۵	۲۶۷/۲۴	۷۰۷/۳۹	۰/۰۰۰
درجه دوم	۴	۲۸۲/۳۶	۷۰/۵۹	۱۸۶/۸۶	۰/۰۰۰
اثرات متقابل	۶	۱۷/۶۰	۲/۹۳	۷/۷۶	۰/۰۰۱
خطای باقیمانده	۱۲	۴/۵۳	۰/۳۸		
عدم برازش	۱۰	۴/۴۵	۰/۴۵	۱۱/۱۳	۰/۰۸۵
خطای خالص	۲	۰/۰۸	۰/۰۴		
کل	۲۶	۱۳۷۳/۴۴			
ضریب تبیین			۰/۹۹۶۷		
ضریب تبیین تعدیل شده			۰/۹۹۲۸		

گذشت زمان در آغاز استخراج به این دلیل بوده که زمان‌های طولانی‌تر، زمان واکنش بیشتری را فراهم می‌کند، بنابراین انتقال جرم پکتین از ذره به محلول افزایش می‌یابد. با این وجود، عملکرد پکتین پس از نقطه ی اوج (۸۵ دقیقه) کاهش یافته است که احتمالاً به دلیل تاثیر اسید بر پکتین بوده که ممکن است پیوند گلیکوزیدی و پیوند استری پکتین را از بین برده باشد و در نهایت منجر به کاهش راندمان پکتین شود (Jafari et al., 2017). این نتیجه مشابه با گزارشات Liew et al. (2014) بوده است. نسبت مایع به جامد یکی دیگر از فاکتورهای موثر بر عملکرد پکتین می‌باشد. همانطور که از شکل ۱ (الف و ب) مشخص است راندمان پکتین با کاهش نسبت مایع به جامد، افزایش می‌یابد که احتمالاً به دلیل افزایش انرژی جذب شده به وسیله ماتریکس جامد و در نتیجه افزایش راندمان استخراج می‌باشد (Hosseini et al., 2016c).

در این تحقیق فاکتور دما، به عنوان یکی دیگر از فاکتورهای استخراج اسیدی، تاثیر قابل توجهی بر عملکرد پکتین داشته است. در شکل ۱ (ج) اثر مثبت فاکتور دما بر راندمان استخراج نشان داده شده است. با توجه به شکل با افزایش دما از ۷۰ به ۹۰ درجه سلسیوس راندمان پکتین به طور قابل توجهی افزایش یافته است. اگرچه ممکن است استفاده از دماهای بالاتر باعث افزایش راندمان استخراج شود، ولی به دلیل تخریب حرارتی بیش از حد پکتین و همچنین مصرف انرژی بالا، استفاده از این دماها توصیه نمی‌شود. افزایش راندمان استخراج با افزایش دما احتمالاً بخاطر افزایش حلالیت این پلی‌ساکارید در حلال و به دنبال آن افزایش سرعت انتقال جرم آن از ذرات ماده گیاهی جامد به داخل حلال است (Hosseini et al., 2016c). این نتیجه مشابه با گزارشات Kazemi et al. (2019d) و Raji et al. (2017) بوده است. عامل مهم دیگر در استخراج پکتین زمان است. همانطور که از شکل ۱ (ب و د) مشخص است، افزایش عملکرد پکتین با



شکل ۱- تاثیر فاکتورهای مختلف شامل دما (درجه سلسیوس)، زمان فرایند (دقیقه)، pH و نسبت مایع به جامد (حجمی/وزنی) بر راندمان استخراج پکتین

درجه استریفیکاسیون

درجه استریفیکاسیون یکی از مهمترین فاکتورهای تعیین کننده نوع کاربرد پکتین می باشد. نتایج به دست آمد نشان داد که پکتین استخراج شده از تفاله غوره در شرایط بهینه (زمان ۸۵ دقیقه، دمای ۹۰ درجه سلسیوس، pH برابر با ۱/۵ و نسبت مایع به جامد ۲۰ حجمی/وزنی) دارای درجه استری ۲/۶ ± ۵۱/۶ درصد بوده است که نشان می دهد پکتین حاصل جزو پکتین با درجه استری بالا بوده است. آنچه مسلم است درجه استری پکتین به نوع منبع و روش استخراج بستگی دارد. به هر حال، این فاکتور برای پکتین تفاله غوره بالاتر از پکتین نوعی کاکتوس به نام *Opuntia ficus Indica* (۴۱/۴۲ درصد، Bayar et al., 2017) استخراج شده به روش اولتراسوند و کمتر از پکتین پوست گریپ فروت (۶۷/۵۹ درصد، Wang et al., 2015) استخراج شده به روش اولتراسوند می باشد.

درصد گالاکتورونیک اسید

محتوای گالاکتورونیک اسید موجود در ساختار پکتین کلیدی ترین فاکتور برای ارزیابی خلوص این پلی ساکارید می باشد (Yapo et al., 2007). بر اساس قوانین سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد و همچنین اتحادیه اروپا، پکتین مورد استفاده در صنعت غذا باید حداقل دارای ۶۵ درصد گالاکتورونیک اسید باشد (Bagherian et al., 2011). نتایج نشان داد که پکتین استخراج شده از تفاله غوره دارای محتوای گالاکتورونیک اسید ۳/۵ ± ۶۶/۰ درصد بوده است که نشان می دهد این پکتین مناسب برای استفاده در صنایع غذایی می باشد. تاکنون در تحقیقات متعددی این فاکتور مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج نشان می دهد که نوع ضایعات استفاده شده بعنوان منبع پکتین، روش استخراج و شرایط استخراج از جمله فاکتور کلیدی در محتوای گالاکتورونیک اسید می باشند. همچنین در مقایسه با سایر منابع می توان بیان داشت که پکتین بدست آمده در این تحقیق دارای محتوای گالاکتورونیک اسید تقریباً برابر با پکتین پوست بادمجان (۶۶/۰۸ درصد) استخراج شده به روش اولتراسوند بوده است (Kazemi et al., 2019c).

ظرفیت نگهداری آب و روغن

ظرفیت نگهداری آب (WHC) و ظرفیت نگهداری روغن (OHC) از جمله مهمترین خصوصیات عملکردی پکتین می باشد که قابلیت یک نمونه برای نگهداری آب یا روغن را نشان می دهد. در واقع، پکتین با ظرفیت نگهداری آب بالاتر می تواند برای حفظ آب و بهبود خواص حسی در سیستم های غذایی (مانند ماست) استفاده شود. از طرفی، پکتین با مقدار ظرفیت نگهداری روغن

بالا می تواند به عنوان یک تثبیت کننده و امولسیفایر خوب در سیستم های غذایی با چربی بالا بکار رود (Kazemi et al., 2019b). نتایج نشان داد که پکتین تفاله غوره دارای ظرفیت نگهداری آب و روغن به ترتیب برابر با ۰/۲ ± ۶/۷ (گرم آب/گرم پکتین) و ۰/۲ ± ۱/۴ (گرم روغن/گرم پکتین) بوده است. میزان WHC بدست آمده از پکتین تفاله غوره بیشتر از نتیجه به دست آمده از پکتین پوست سبز پسته (۴/۱۱ گرم/گرم، Kazemi et al., 2019a) استخراج شده به روش میکروویو می باشد. عوامل درونی و بیرونی مختلفی مانند میزان گروه های هیدروکسیل آزاد در ساختار شیمیایی، تخلخل پکتین، نوع روش استخراج و pH می تواند بر WHC تاثیر گذار باشند (Bayar et al., 2018). همچنین میزان OHC پکتین تفاله غوره به میزان جزئی از OHC پکتین کاکتوس *Opuntia ficus Indica* (۱/۲۳ گرم/گرم، Bayar et al., 2018) استخراج شده به روش آنزیمی بیشتر می باشد. تراکم بار و ماهیت آب گریزی برخی از اجزا مهمترین فاکتورهای موثر بر OHC پکتین هستند (Bayar et al., 2017).

خصوصیات امولسیفایری

در این پژوهش، فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون پکتین حاصل از تفاله غوره در شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. پس از تشکیل امولسیون ها سه فاز مشاهده شد. فاز روغن به دلیل چگالی کمتر در بالا و فاز محلول به دلیل چگالی بیشتر در پایین و فاز امولسیون به دلیل چگالی متوسط در وسط قرار گرفتند. نتایج نشان داد که فعالیت امولسیفایری که بنا به تعریف حجم لایه امولسیونی به حجم کل می باشد برابر با ۱/۹ ± ۵۷/۲ درصد بوده است که بالاتر از نتایج گزارش شده برای پکتین کاکتوس *Opuntia ficus Indica* استخراج شده به روش سنتی (محلول آب داغ) بوده است (Bayar et al., 2016). همچنین امولسیون ها پایداری نسبتاً خوبی را در دماهای ۴ و ۲۳ درجه سلسیوس بعد از ۱ و ۳۰ روز نشان دادند که بالاترین پایداری امولسیون مربوط به دمای ۲۳ درجه سلسیوس بعد از ۱ روز به میزان ۰/۹ ± ۹۳/۲ درصد بوده است. همچنین اختلاف پایداری امولسیون در دماهای مذکور بین ۱ و ۳۰ روز نشان داد که بهترین اختلاف پایداری امولسیون مربوط به دمای ۴ درجه سلسیوس به میزان ۸/۳ درصد بوده که پایداری به مراتب مناسب تری از دمای ۲۳ درجه سلسیوس به میزان ۹/۲۲ درصد داشته است. همچنین نتایج نشان داد که پکتین تفاله غوره از نظر پایداری امولسیونی، پایدارتر از پکتین پوست و کالیکس بادمجان استخراج شده به روش میکروویو توسط Kazemi et al. (2019b) بوده است.

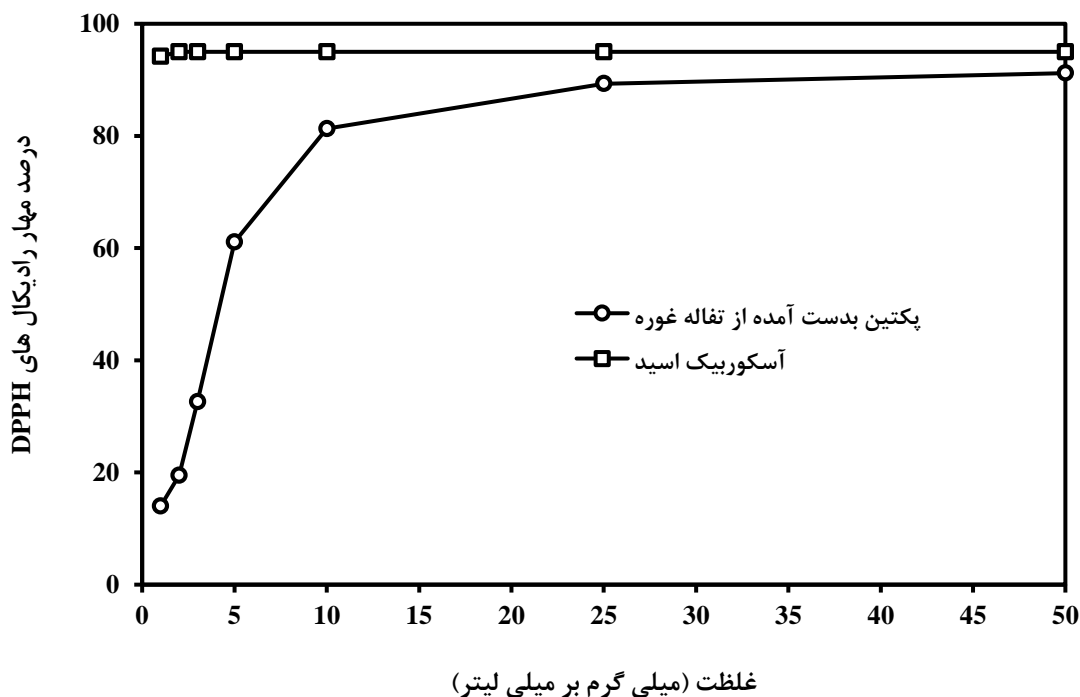
جدول ۴- فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون‌های روغن / محلول ۰/۵ درصد حجمی/وزنی پکتین تفاله غوره

پایداری امولسیون (درصد)				فعالیت امولسیفایری (درصد)	
۳۰ روز		۱ روز		زمان نگهداری دما (درجه سلسیوس) پکتین	
۲۳	۴	۲۳	۴	۲۳	
۸۴/۲±۰/۲	۸۴/۴±۳/۱	۹۳/۰±۲/۹	۹۲/۱±۶/۹	۵۷/۱±۲/۹	

کاکتوس *Opuntia Ficus Indica* استخراج شده به روش اولتراسوند توسط Bayar *et al.* (2017) بوده است. به عنوان مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پکتین تفاله غوره با پکتین پوست نارنج که به روش اولتراسوند توسط Hosseini *et al.* (2019) استخراج شده است، می‌توان چنین بیان کرد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پکتین تفاله غوره در غلظت‌های زیر ۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بالاتر از پکتین پوست نارنج بوده اما در غلظت‌های بالاتر فعالیت نسبتاً برابری داشته‌اند. همچنین نتایج نشان داد که پکتین تفاله غوره در تمامی غلظت‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از پکتین کالیکس بادمجان که به روش مایکروویو توسط Kazemi *et al.* (2019b) استخراج شده، داشته است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب پکتین تفاله غوره می‌تواند مربوط به محتوای گالاکتورونیک اسید بالای آن باشد (Kazemi *et al.*, 2019a).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است، که به طور گسترده‌ای به عنوان ابزاری برای برآورد فعالیت‌های ضد رادیکالی آنتی‌اکسیدان‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Chaouch *et al.*, 2015). با توجه به شکل ۲، رفتار وابسته به غلظت برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پکتین تفاله غوره تا غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید اما در بالاتر از این غلظت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقریباً ثابت شده و با افزایش غلظت حتی تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش چندانی نداشته است. در حالی که، نمونه آسکوربیک اسید، حتی در غلظت‌های پایین نیز بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی خود را داشته است. نتایج نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پکتین تفاله غوره در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بالاتر از فعالیت بدست آمده از پکتین

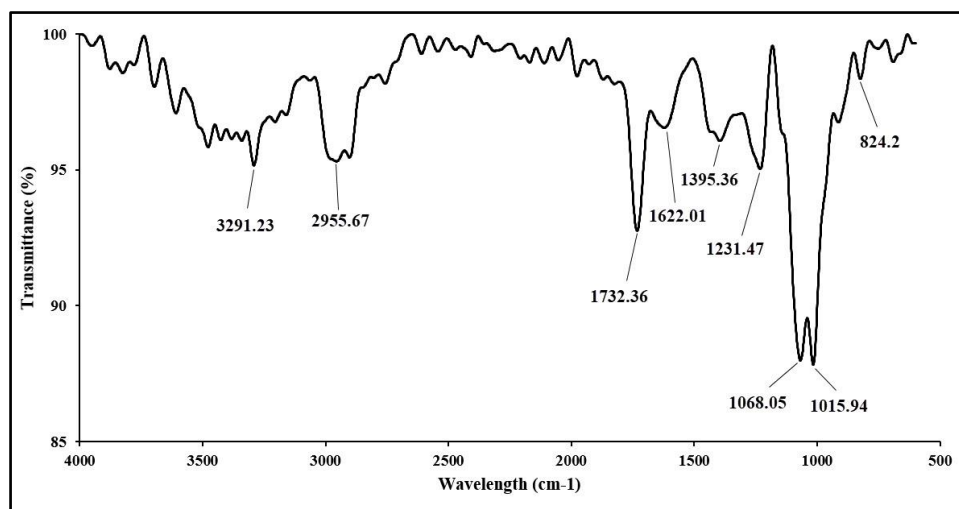


شکل ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی پکتین تفاله غوره استخراج شده در شرایط بهینه (زمان ۸۵ دقیقه، دما ۹۰ درجه سلسیوس، pH برابر با ۱/۵ و نسبت مایع به جامد ۲۰ حجمی/وزنی)

بررسی طیف سنجی تبدیل فوریه (FT-IR)

بررسی طیف FT-IR بدست آمده از نمونه‌های پکتین از جمله روش‌های بسیار پر کاربرد و موثر در شناسایی این پلیمر می‌باشد. از این رو طیف FT-IR پکتین بدست آمده از تفاله غوره در شرایط بهینه بررسی گردید (شکل ۳). با توجه به این شکل، سیگنال جذبی مشاهده شده در دامنه عدد موجی بین ۳۵۰۰ تا ۳۰۰۰ بر سانتی متر مربوط به اتصالات درون و برون مولکولی گروه‌های OH واحدهای گالاکتورونیک اسید می‌باشد (Kazemi et al., 2019d). همچنین، پیک‌های موجود در دامنه‌ی ۳۰۰۰ تا ۲۸۰۰ بر سانتی متر مربوط به اتصالات C-H گروه‌های CH₂ و CH₃ می‌باشد (Santos et al., 2013). سیگنال‌های مشاهده شده در ۱۷۵۰ تا ۱۷۰۰ بر سانتی متر و ۱۶۵۰ تا ۱۶۰۰ بر سانتی متر به ترتیب نشات گرفته از گروه‌های کربوکسیل استری شده و آزاد

موجود در واحدهای گالاکتورونیک اسید است (Kazemi et al., 2019b). همچنین، سیگنال‌های مرتبط با گروه‌های گلیکوزیدی (C-O-C) واحدهای گالاکتورونیک اسید در دامنه ۱۲۵۰ تا ۱۰۰۰ بر سانتی متر مشاهده شده‌اند (Pasandide et al., 2018). به سیگنال‌های موجود در ناحیه بین ۱۲۰۰ و ۸۰۰ بر سانتی متر منطقه اثر انگشت می‌گویند که یک ناحیه منحصر به فرد بوده و عموماً تفسیر باندهای آن دشوار می‌باشد (Kostalova et al., 2013). با توجه به شواهد ذکر شده در بالا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ساختار پکتین استری شده در نمونه پکتین تفاله غوره وجود داشته و حضور پکتین در این نمونه توسط طیف FT-IR تایید می‌شود. همچنین قابل ذکر است نتایج بدست آمده در بالا مطابق با گزارشات قبلی توسط سایر محققین بوده است (Grassino et al., 2016; Wang et al., 2016; Pasandide et al., 2018; Hosseini et al., 2019).



شکل ۳- طیف FT-IR پکتین استخراج شده در شرایط بهینه (زمان ۸۵ دقیقه، دما ۹۰ درجه سلسیوس، pH برابر با ۱/۵ و نسبت مایع به جامد ۲۰ حجمی/وزنی) در دامنه عدد موجی ۶۰۰-۴۰۰۰ بر سانتی متر

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، بهینه‌سازی استخراج پکتین از تفاله غوره به روش اسیدی و با استفاده از اسید سیتریک مورد مطالعه قرار گرفت. بالاترین راندمان تولید پکتین در شرایط بهینه استخراج (زمان ۸۵ دقیقه، دمای ۹۰ درجه سلسیوس، pH برابر با ۱/۵ و نسبت مایع به جامد ۲۰ (حجمی/وزنی)) برابر با $1/0 \pm 26/1$ درصد به دست آمد. بررسی‌ها نشان دادند که پکتین تفاله غوره از نظر درجه استری و محتوای گالاکتورونیک اسید دارای درجه خلوص مطلوبی بوده و پکتین حاصل جزو پکتین‌های با درجه استری بالا

محسوب می‌شود. همچنین پکتین تفاله غوره از نظر خصوصیات عملکردی به‌ویژه خاصیت امولسیون‌ی نتایج قابل قبولی را نشان داد که می‌تواند به عنوان یک امولسیون کننده خوب در صنعت غذا مورد استفاده قرار گیرد. همچنین پکتین تفاله غوره از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارای نتیجه مطلوبی بود. طیف FT-IR نیز حضور پکتین غنی از زنجیره گالاکتورونیک اسید استری شده را تایید کرد. به‌طور کلی، با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، می‌توان بیان داشت که پکتین تفاله غوره را نیز می‌توان در کنار پکتین حاصل از منابع تجاری در صنایع مختلف مورد استفاده قرار داد. هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

Bagherian, H., Ashtiani, F. Z., Fouladitajar, A. & Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between

conventional, microwave-and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit.

- Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11-12), 1237-1243.
- Bayar, N., Kriaa, M. & Kammoun, R. (2016). Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 441-450.
- Bayar, N., Bouallegue, T., Achour, M., Kriaa, M., Bougatef, A. & Kammoun, R. (2017). Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. *Food Chemistry*, 235, 275-282.
- Bayar, N., Friji, M. & Kammoun, R. (2018). Optimization of enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal. *Food Chemistry*, 241, 127-134.
- Bitaraf, M. S., Khodaiyan, F., Mohammadifar, M. A. & Mousavi, S. M. (2012). Application of response surface methodology to improve fermentation time and rheological properties of probiotic yogurt containing *Lactobacillus reuteri*. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1394-1401.
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Chaouch, M. A., Hafsa, J., Rihouey, C., Le Cerf, D., & Majdoub, H. (2015). Depolymerization of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*: Antioxidant and antiglycated activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 779-786.
- Colodel, C. & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2019). Acid extraction and physicochemical characterization of pectin from cubiu (*Solanum sessiliflorum* D.) fruit peel. *Food Hydrocolloids*, 86, 193-200.
- Dalev, P.G. & 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.
- FAO. (2010). Food and Agricultural Organization of United Nations: Economic and Social Department: The Statistical Division.
- Grassino, A. N., Brnčić, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M. & Brnčić, S. R. (2016). Ultrasound-assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry*, 198, 93-100.
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F. & Yarmand, M. S. (2016a). Optimization of microwave-assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 140, 59-65.
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F. & Yarmand, M. S. (2016b). Effect of acid extraction conditions on yield and quality characteristics of pectin from sour orange peel. *Iranian Journal of Bipsystem Engineering*, 47(2), 231-242. (In Farsi)
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F. & Yarmand, M. S. (2016c). Aqueous extraction of pectin from sour orange peel and its preliminary physicochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 920-926.
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Kazemi, M. & Najari, Z. (2019). Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound-assisted method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 621-629.
- Jafari, F., Khodaiyan, F., Kiani, H. & Hosseini, S. S. (2017). Pectin from carrot pomace: Optimization of extraction and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1315-1322.
- Karabiyikli, Ş. & Öncül, N. (2016). Inhibitory effect of unripe grape products on foodborne pathogens. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(6), 1459-1465.
- Kazemi, M., Khodaiyan, F., Labbafi, M., Hosseini, S. S. & Hojjati, M. (2019a). Pistachio green hull pectin: Optimization of microwave-assisted extraction and evaluation of its physicochemical, structural and functional properties. *Food Chemistry*, 271, 663-672.
- Kazemi, M., Khodaiyan, F. & Hosseini, S. S. (2019b). Utilization of food processing wastes of eggplant as a high potential pectin source and characterization of extracted pectin. *Food Chemistry*, 294, 339-346.
- Kazemi, M., Khodaiyan, F. & Hosseini, S. S. (2019c). Eggplant peel as a high potential source of high methylated pectin: Ultrasonic extraction optimization and characterization. *LWT*, 105, 182-189.
- Kazemi, M., Khodaiyan, F., Hosseini, S. S. & Najari, Z. (2019d). An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan. *Waste Management*, 100, 101-111.
- Kostalova, Z., Hromadkova, Z., Ebringerova, A., Polovka, M., Michaelsen, T. E. & Paulsen, B. S. (2013). Polysaccharides from the *Styrian oilpumpkin* with antioxidant and complement-fixing activity. *Industrial Crops and Products*, 41, 127-133.
- Liew, S. Q., Chin, N. L. & Yusof, Y. A. (2014). Extraction and characterization of pectin from passion fruit peels. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 231-236.
- Liu, L., Fishman, M. L. & Hicks, K. B. (2007). Pectin in controlled drug delivery—a review. *Cellulose*, 14(1), 15-24.
- Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y. & Yao, J. (2010). Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresource Technology*, 101(9), 3268-3273.
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M. & Brnčić, S. R. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 28-37.
- Maran, J. P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K. & Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave-assisted extraction of pectin from

- orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 703-709.
- Maran, J. P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K. & Sridhar, R. (2014). Microwave-assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydrate Polymers*, 101, 786-791.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266-277.
- Öncül, N. & Karabiyikli, Ş. (2015). Factors affecting the quality attributes of unripe grape functional food products. *Journal of Food Biochemistry*, 39(6), 689-695.
- Pasandide, B., Khodaiyan, F., Mousavi, Z. & Hosseini, S. S. (2018). Pectin extraction from citron peel: optimization by Box–Behnken response surface design. *Food Science and Biotechnology*, 27(4), 997–1005.
- Qiu, L. P., Zhao, G. L., Wu, H., Jiang, L., Li, X. F. & Liu, J. 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.
- Raji, Z., Khodaiyan, F., Rezaei, K., Kiani, H. & Hosseini, S. S. (2017). Extraction optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 709-716.
- Santos, J. D. G., Espeleta, A. F., Branco, A. & de Assis, S. A. (2013). Aqueous extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1997-2001.
- Shao, P., Wang, P., Niu, B. & Kang, J. (2018). Environmental stress stability of pectin-stabilized resveratrol liposomes with different degree of esterification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 53-59.
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, S. M., Tiwari, B., Hashemi, M., Fadavi, G. & Khaksar, R. (2013). Polyphenols content and antioxidant activity of Ghure (unripe grape) marc extract: influence of extraction time, temperature and solvent type. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 412-418.
- Swamy, G. J. & Muthukumarappan, K. (2017). Optimization of continuous and intermittent microwave extraction of pectin from banana peels. *Food Chemistry*, 220, 108-114.
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., Ye, X. & Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry*, 178, 106-114.
- Wang, W., Ma, X., Jiang, P., Hu, L., Zhi, Z., Chen, J., Ding, T., Ye, X. & Liu, D. (2016). Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions. *Food Hydrocolloids*, 61, 730-739.
- Willats, W. G., Knox, J. P. & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17(3), 97-104.
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X. & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126, 72-81.
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B. & 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.