

استخراج و خالص‌سازی اسید آلژینیک از جلبک‌های قهوه‌ای سواحل جنوب شرقی ایران

محمد حاجی ابوالحسنی*

ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده فناوریهای شیمیایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۱۱

چکیده

اسید آلژینیک پلی ساکاریدی با ارزش است که از جلبک‌های قهوه‌ای استخراج و بعنوان تغلیظ‌کننده، قوام‌دهنده، پایدارکننده و توانایی تشکیل ژل بطور وسیعی در صنایع غذایی، دارویی، زیست‌پزشکی، آرایشی، نساجی، رنگ و چاپ استفاده می‌گردد. روش استخراج و شرایط محیطی از جمله عوامل تاثیرگذار بر بازده فرآیند استخراج بوده که بررسی آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در این تحقیق از دو روش اسیدیفیکاسیون و کلسیفیکاسیون بمنظور مقایسه بازده استخراج اسید آلژینیک استفاده شده و تاثیر عواملی چون دما، غلظت و زمان جهت تعیین شرایط بهینه استخراج، بررسی گردیده است. از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز برای شناسایی و مقایسه اسید آلژینیک تهیه شده با نمونه استاندارد و از روش‌های مندرج در رفرانس Food Chemicals Codex برای آنالیز آن استفاده گردیده است. بر اساس این نتایج، بازده استخراج اسید آلژینیک بروش کلسیفیکاسیون ۸٪ افزایش نسبت بروش اسیدیفیکاسیون داشته است. علاوه بر این غلظت ۳٪ اسید مصرفی با زمان ۲ ساعت، غلظت ۴٪ قلبای مصرفی با زمان ۶ ساعت و نیز دمای ۴۰°C پارامترهای محیطی مهم بر افزایش بازده استخراج تشخیص داده شد. نتایج بدست آمده از آنالیز اسید آلژینیک با میانگین خلوص ۹۳/۵۷٪، خاکستر ۳/۱۳٪، کاهش وزن پس از خشک کردن ۱۳/۲٪، خاکستر سولفات ۷/۳۳٪، فلزات سنگین برپایه سرب کمتر از ۰/۰۰۴٪، سرب کمتر از ۱۰ ppm و آرسنیک کمتر از ۳ ppm همگی در محدوده مجاز تعیین شده بوده و لذا می‌تواند بعنوان اسید آلژینیک با گرید غذایی معرفی گردد. داده‌های طیف سنجی نیز مطابقت کامل با نمونه استاندارد را نشان داده است.

واژه‌های کلیدی: جلبک قهوه‌ای سارگاسوم، اسید آلژینیک، روش‌های استخراج، اسیدیفیکاسیون، کلسیفیکاسیون

* نویسنده مسئول، تلفن: ۵۷۴۱۶۲۷۰-۰۲۱، پست الکترونیکی: haji_7368@yahoo.com

مقدمه

متمایز یافته بوده که هرگز ریشه، ساقه و برگ‌های حقیقی را تشکیل نمی‌دهند. پیکر یک جلبک بعنوان تال شناخته شده است که براین اساس در قلمرو بزرگ گیاهان غیر آوندی بنام تالداران قرار گرفته‌اند. جلبک‌های قهوه‌ای یک گروه نسبتاً بزرگ و متنوعی را از میان سایر جلبک‌ها تشکیل می‌دهند که اکثراً ساکن سواحل صخره‌ای بوده و بخصوص در مناطق جزر و مدی شدید می‌رویند. لذا با نگهدارنده‌های قوی و منشعب خود به سنگ و صخره سفت شده‌اند. اسید آلژینیک پلی ساکارید طبیعی با ارزش در غشاء سلولی جلبک‌های قهوه‌ای می‌باشد که بصورت

بطور کلی جلبک‌ها به سه دسته کلی جلبک‌های سبز (Chlorophyta)، قرمز (Rhodophyta) و قهوه‌ای (Phaeophyta) تقسیم بندی می‌شوند و بعنوان منبع انحصاری تولید فیکوکلونیدهای تجاری و صنعتی مهم همچون کاراگینان، آگار، اسید آلژینیک و فوکوئیدان بشمار می‌روند (۳۱، ۲، ۲۴ و ۱۷). همچنین جلبک‌ها بجهت اینکه حاوی بیش از ۶۰ نوع عناصر کمیاب، کربوهیدرات، ید، برم، ویتامین و مواد زیست فعال هستند، بعنوان خوراک دام و کودزیستی برای محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۰ و ۱۸). جلبک‌ها دارای بافتهای نسبتاً غیر

آلژیناتها بواسطه خواص کلوئیدی و غیر سمی بودن، از آنها بعنوان تغلیظ کننده، قوام دهنده و پایدارکننده و توانایی در تشکیل ژل بطور وسیعی در صنایع غذایی، دارویی، زیست پزشکی، آرایشی، نساجی، کاغذ سازی، رنگ، چاپ و نیز دندانپزشکی برای ساخت قالب دندان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱، ۹، ۳۳، ۳۷ و ۲۱). تحقیقات انجام شده در سالهای اخیر، بجهت سازگاری آلژینات با بافت، از آن در مهندسی بافت، از جمله تولید نسوج بافت پوست، غضروف، استخوان، پانکراس، کبد، عضلات و اعصاب و نیز در انکپسوله کردن داروها برای آزادسازی کنترل شده آنها در سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲، ۲۶، ۱۳ و ۶).

در این تحقیق استخراج اسید آلژینیک $(C_6 H_8 O_6)_n$ از جلبکهای قهوه ای با استفاده از دو روش ارائه شده از سوی سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (Food and Agriculture Organization of the united nations) انجام شده است که در روش اول ابتدا ماده حدواسط کلسیم آلژینات حاصل و سپس تبدیل به اسید آلژینیک گردیده اما در روش دوم مستقیماً اسید آلژینیک بدست می‌آید. تفاوت این دو روش در جداسازی های فیزیکی مورد نیاز (همچون فیلتراسیون محلول ویسکوز و آبگیری از رسوب ژلاتینی) در فرآیند استخراج بوده که بر راندمان محصول نهایی تاثیرگذار می‌باشد (۲۷).

هدف اصلی در این پژوهش تهیه اسید آلژینیک با خلوص بالا (گریذغذایی) از جلبک قهوه ای *Sargassum sp.* بومی ایران

(واقع در سواحل جنوب شرقی) بود، لذا آنالیزها با استفاده از روشهای ارائه شده در فرانس FCC 9th (Food chemical codex 9th edition) انجام گردیده و از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) برای شناسایی و مقایسه با نمونه استاندارد آن، استفاده شده است. در این

ترکیب ساختمانی دیواره های سلولی آنها، بشکل مخلوط نمکهای محلول و غیر محلول سدیم، پتاسیم، منیزیم و کلسیم وجود دارد (۳۵ و ۲۰). اسید آلژینیک اولین بار در سال ۱۸۸۱ توسط یک شیمیدان انگلیسی بنام Stanford کشف شد. استخراج آلژینات از جلبکهای قهوه ای بکمک محلول رقیق قلیائی روشی است که از زمان استانفورد باقی مانده و بهمین علت به کلیه روشهای وابسته به قلیائی نام استانفورد اطلاق می‌گردد. دو روش متداول دیگر که بهبود یافته روش استانفورد می‌باشند، یکی روش Green's cold است که تحت دمای نسبتاً پایین ($10^{\circ}C$) انجام شده و غالباً برای فیلتر کردن از کمک فیلتر و فیلتراسیون تحت فشار و برای رنگبری از مواد سفیدکننده مناسب نظیر هیپوکلریت سدیم استفاده می‌گردد، لذا محصول سفیدتری تولید می‌شود. دیگری روش Le-Gloahec-Heter است که مزایایی نسبت به روش قبلی دارد، منجمله اینکه کدورت زدایی پساب با دمیدن حبابهای گاز درون محلول انجام می‌شود، لذا فیلتر کردن با کمک فیلتر و استفاده از فیلتر پرس ضرورتی ندارد و رنگبری با ژل جاذب رنگ و یا منعقد کننده پروتئینی انجام می‌شود. بنابراین رسوبدهی آلژینات کلسیم که برای سفیدگری و تخلیص بیشتر صورت می‌گیرد، می‌تواند حذف شود (۳). آزمایشات انجام شده با روش $^{13}C-NMR$ نشان داده که ساختار شیمیایی اسید آلژینیک متشکل از یک پلیمر خطی است که از دو واحد مونومری بنامهای بتا-دی-مانورونیک اسید (M) و آلفا-ال-گلوگونیک اسید (G) و با پیوندگلیکوزیدی بین کربن شماره ۱ یک مونومر با کربن شماره ۴ مونومر دیگر تشکیل شده است (۲۱، ۱۹، ۱۱ و ۲۸). توالی مونومرهای M&G می‌تواند در گونه های مختلف جلبک و یا حتی در بافت های مختلف یک گونه متفاوت باشد بطوریکه بلوکهای هموزن (محتوی poly-G & poly-M) و یا هتروژن با بلوکهای MG است که این ساختار بر خواص فیزیکوشیمیایی آلژیناتها تاثیرگذار می‌باشد (۳۶، ۳۲، ۸ و ۱۶).

شفاف آلژینات سدیم حاصل گردد. به این محلول شفاف همراه با همزدن، ۶۰۰mL محلول کربنات کلسیم ۱۰٪ اضافه نموده تا فیبر آلژینات کلسیم رسوب کند. پس از افزودن ۱۰۰mL محلول هیپوکلریت سدیم ۱۲٪ به سوسپانسیون آلژینات کلسیم در آب جهت رنگبری، رسوب فیبری بوسیله یک غربال از محلول جدا و با آب شستشو داده شد. سپس آلژینات کلسیم را بترتیب به سه مخزن محتوی ۲۰۰mL اسید معدنی ۰/۱M اضافه کرده و بعد از ۳۰ دقیقه همزدن، نهایتاً ماده جامد را که اسید آلژینیک خالص است، بوسیله یک غربال از محلول جدا کرده و با آب شستشو داده شد. pH در هر سه مخزن بایستی تا کمتر از ۲ تنظیم گردد. بالاخره با فشرده شدن اسید آلژینیک فیبری شکل، محصول آگیری شده بدست آمد (در این مرحله محصول حاوی ۲۵٪ ماده خشک است). در انتهای این مرحله فیبرهای اسید آلژینیک بدست آمده بعد از خشک کردن در آون، آسیاب نموده و پودر حاصله توزین گردید (۳۹ و ۲۷).

استخراج و خالص سازی به روش اسیدیفیکاسیون: در این روش تا تهیه محلول شفاف آلژینات سدیم، مشابه روش کلسیفیکاسیون بوده اما بجهت اینکه فاقد مرحله آلژینات کلسیم بوده و مستقیماً اسید آلژینیک تهیه می گردد، لذا مراحل بعدی آن بصورت زیر انجام شده است.

در این مرحله محلول آلژینات سدیم استخراج شده با ۳۰۰mL محلول اسید معدنی ۰/۱M، بمدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق

عمل آوری شده و رسوب ژلاتینی اسید آلژینیک تشکیل شد. ژل بدست آمده ابتدا با نیروی فشار پرس فشرده شدند تا آب بین ژلها خارج گردد. سپس ژل را با ۲۵۰mL اتانول مخلوط کرده تا بصورت رسوب درآید (این مرحله محصول حاوی ۱۵٪ ماده خشک است). رسوب حاصله را بعد از فیلتراسیون در آون گذاشته، خشک گردید. بعد از آن اسید آلژینیک خشک شده را آسیاب نموده و پودر حاصله

تحقیق اسیدآلژینیک بدو روش کلسیفیکاسیون (Calcification) و اسیدیفیکاسیون (Acidification) تهیه، مزایا و معایب هر دو روش نسبت بیکدیگر و بازده محصول مقایسه شده است. همچنین با بررسی عوامل محیطی تاثیرگذار بر استخراج از نظر دما، غلظت و زمان، شرایط بهینه استخراج اسیدآلژینیک تعیین گردیده است.

مواد و روشها

جمع آوری جلبک: جلبک قهوه ای *Sargassum sp.* از قسمتهای پایین و کم عمق بین جزر و مدی روی سطح بسترهای صخره ای دریای عمان در استان سیستان و بلوچستان، به عرض جغرافیایی حدود ۲۵°۱۷' و طول جغرافیایی حدود ۶۰°۳۹' جمع آوری شده است. نمونه ها در محل جمع آوری شده با آب دریا شسته و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

استخراج و خالص سازی به روش کلسیفیکاسیون: ابتدا جلبکهای جمع آوری شده از مواد زائد جدا گردیده، آنها را پس از شستشو در برابر جریان هوا قرار داده تا خشک گردد. جلبکهای خشک شده در محدوده مش $1\text{cm} < a < 8\text{cm}$ آسیاب گردید. ۱۰۰g جلبک خشک شده در ۲۰۰mL اسید معدنی ۰/۱M بمدت یکساعت در دمای محیط غوطه ور نموده و با فیلتراسیون از محلول جدا شدند. سپس جلبکها در یک مخزن محتوی ۲۰۰mL محلول هیدروکسید سدیم ۳ N /۳، نرمال، در دمای ۵۰°C بمدت ۳ ساعت همزده شد. در این مرحله محلول استخراج شده ۵-۳ برابر هم حجم خود با آب مقطر رقیق شد. سپس مقدار کمی ماده Flocculant (مثل پرلیت) به آن افزوده و حبابهای هوا بداخل این محلول دمیده شد تا ذرات ریزشناور (ناخالصیها) همراه با حبابهای هوا با تشکیل یک کیک بر روی سطح محلول آمده و براحتی جمع آوری گردد. محلول نیمه شفاف حاصله بمدت ۳۵ دقیقه، با ۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای محیط سانتریفوژ گردید تا باقیمانده ذرات ریز احیانا باقیمانده، از محلول جدا شده و نهایتاً محلول

Tukey's HSD از روش تست one-way ANOVA بمنظور ارزیابی عوامل محیطی موثر بر بازده محصول، برای اندازه‌گیری میزان محصول استفاده گردیده است. نتایج آزمایشات نیز با استفاده از Excel 2003 بصورت Mean±SD از سه تکرار، گزارش شده است.

آزمایشات شناسایی کیفی مطابق با فرانس FCC (۱۴)

آزمایش با کلرورکلسیم (TS= Test Solution):
 ۱g اسید آلزینیک رادر ۱۵۰mL هیدروکسی سدیم ۰/۱N حل کرده، به ۵mL از این محلول آماده شده، ۱mL کلرورکلسیم TS (۰/۷/۵) اضافه شد تا رسوب حجیم ژلاتینی تشکیل گردد.

آزمایش با اسید سولفوریک رقیق TS: ۱g اسید آلزینیک رادر ۱۵۰mL هیدروکسی سدیم ۰/۱N حل کرده، به ۵mL از این محلول آماده شده، ۱mL اسید سولفوریک رقیق TS (۰/۱۰) اضافه شد تا رسوب توده ای و متراکم ژلاتینی تشکیل گردد.

آزمایش با رزورسینول (Resorcinol): بحدود ۵mg اسید آلزینیک در لوله آزمایش محتوی ۵mL آب مقطر، ۱mL محلول ۱٪ نفتول رزورسینول در الکل تازه تهیه شده و ۵mL اسید کلریدریک اضافه کرده و تا بجوش آمدن حرارت داده شد و بآرامی بمدت ۳ دقیقه جوشاندن ادامه یافت. تا حدود ۱۵°C آنرا سرد کرده و محتویات لوله آزمایش با کمک ۵mL آب مقطر به یک دکاناتور انتقال یافته و با ۱۵mL ایزوپروپیل اتر استخراج گردید. بطور همزمان آزمایش شاهد نیز به همین روش انجام شده است. در حدفاصل فاز آبی و فاز اتری بایستی رنگ بنفش تیره تری در نمونه محتوی اسید آلزینیک نسبت به شاهد، ظاهر گردد.

روش اندازه‌گیری کاهش وزن پس از خشک کردن (روش وزنی Gravimetric determination): ۲-۱ گرم نمونه اسید آلزینیک تهیه شده را دقیقاً وزن کرده به ظرفی که قبلاً وزنش تثبیت شده، منتقل گردید. مجدداً

توزین گردید. در انتها حلال را نیز بازیافت کرده تا مجدداً قابل استفاده شود (۳۹ و ۲۷).

آزمایشات بهینه سازی استخراج: بجهت بالاتر بودن بازده اسید آلزینیک حاصل از روش کلسیفیکاسیون نسبت به روش اسیدیفیکاسیون، از این روش برای آزمایشات بهینه سازی استفاده شده است. لذا عوامل محیطی تاثیرگذار بر بازده فرآیند استخراج همچون دما، غلظت و زمان جهت بهینه سازی شرایط استخراج اسید آلزینیک مورد توجه قرار گرفت. در این راستا کل فرآیند استخراج اسید آلزینیک بدو قسمت کلی شامل: مرحله شستشوی اسیدی و مرحله هضم یا استخراج قلیایی تقسیم بندی گردیده است.

شستشوی اسیدی: تیمار جلبک با اسید معدنی منجر به حذف کلیه ترکیبات فنلی محلول در اسید گردیده، لذا استخراج کارآمدتر، محصول کم رنگتر و افت ویسکوزیته در طول استخراج کاهش می یابد. سه فاکتور در طی این آزمایشات همزمان بررسی شدند. ابتدا اسید با سه غلظت ۱٪، ۳٪ و ۵٪ آماده گردیده و سپس عملیات اسیدی در هر غلظت، در سه زمان ۲، ۴ و ۸ ساعت و سه دمای ۲۰، ۴۰، ۶۰ و با سه بار تکرار انجام شده است.

هضم یا استخراج قلیایی: پارامترهای مورد بررسی در این مرحله شامل درصد قلیا مصرفی (۲٪، ۴٪ و ۸٪)، زمان عملیات استخراج (۲، ۴ و ۸ ساعت) و دمای استخراج (C ۲۰، ۴۰ و ۶۰) بوده که بطور همزمان بررسی شده است. در این آزمایشات ابتدا قلیا با سه غلظت متفاوت تهیه گردیده و سپس عملیات استخراج قلیایی در هر غلظت، در سه زمان و سه دمای فوق الذکر و با سه تکرار انجام شده است.

تجزیه و تحلیل آماری: در بررسی تاثیر عواملی محیطی دما، غلظت و زمان (بعنوان متغیر مستقل) بر بازده محصول (بعنوان متغیر وابسته)، از روش one-way ANOVA و نرم افزار 17 minitab استفاده شده است. سطح معناداری (α) برای همه آزمونهای آماری ۰/۰۵ بود. در آنالیز واریانس

ظرف را همراه با محتویاتش وزن کرده، آنرا به آن که دمای آن در 105°C تنظیم شده منتقل نموده تا بمدت ۴ ساعت در این دما در آن بماند. سپس ظرف محتوی نمونه را از آن خارج کرده و در دسیکاتور قرار داده و پس از رسیدن به دمای محیط، وزن گردید. اختلاف در توزین نمونه قبل از حرارت دادن و بعد از حرارت دادن میزان کاهش وزن نمونه را نشان می‌دهد که حد مجاز آن طبق رفرانس FCC، حداکثر ۱۵٪ می‌باشد (۱۴).

روش اندازه‌گیری خاکستر تام (Total ash): ۳ گرم از نمونه اسیدآلژینیک تهیه شده را دقیقاً وزن کرده به یک کروزه که قبلاً وزنش تثبیت شده، منتقل گردید. کروزه را در کوره با دمای 650°C (بمدت ۲۰ تا ۳۵ دقیقه) حرارت داده تا احتراق کامل صورت گرفته و بدون کربن شود. سپس کروزه از کوره خارج و در دسیکاتور قرار داده تا پس از رسیدن به دمای محیط، توزین گردد. اختلاف وزن نمونه قبل از احتراق و بعد از احتراق، میزان خاکستر نمونه را نشان می‌دهد که حد مجاز درصد خاکستر طبق رفرانس FCC، حداکثر ۴٪ می‌باشد (۱۴).

روش اندازه‌گیری خاکستر سولفات (Sulfated ash): نمونه مشتعل شده و تا زمانی که فقط خاکستر و کربن باقی بماند، سوزانده می‌شود. پس از خنک شدن، باقیمانده با اسید سولفوریک واکنش داده و تا کامل شدن اکسایش کربن، در یک کوره الکتریکی با دمای $775 \pm 25^{\circ}\text{C}$ حرارت داده شد. سپس خاکستر خنک شده، دوباره با اسید سولفوریک واکنش داده و تا رسیدن به وزن ثابت در دمای $775 \pm 25^{\circ}\text{C}$ حرارت داده شد. حد مجاز درصد خاکستر سولفات طبق رفرانس FCC، حداکثر ۸٪ می‌باشد (۱۴).

روش اندازه‌گیری فلزات سنگین برپایه سرب: ابتدا دی‌تیزون انجام شده است. ابتدا بایستی محلول استاندارد سرب تهیه شود که هر میلی‌لیتر آن معادل ۱۰ میکروگرم یون سرب باشد (در آزمایش قبل توضیح داده شده است). یون سرب باشد (۱۴).

۱۵۹/Amg) نیترات سرب که با ۱۰۰mL آب مقطر حاوی ۱mL اسید نیتریک غلیظ به حجم رسانده شده است) با آب مقطر تا ۱۰۰mL رقیق گردید. ۲mL از محلول استاندارد سرب (۲۰ میکروگرم سرب) را به یک تیوپ مقایسه رنگ ۵۰mL، منتقل کرده و به آن تا ۲۵mL آب مقطر اضافه شد. سپس pH آن بین ۳ و ۴ تنظیم و با آب مقطر تا ۴۰mL رقیق گردید. سپس برای تهیه محلولی از نمونه، ۵۰۰mg اسیدآلژینیک تهیه شده را دقیقاً وزن و به یک کروزه منتقل و با اسید سولفوریک بطور کامل مرطوب گردید. بعد محتویات کروزه با هیتر یا شعله سوزانده تا ذغال گردد. پس از کربونیزه شدن نمونه، به آن ۲mL اسیدنیتریک و ۵ قطره اسید سولفوریک افزوده، در کوره با دمای $500-600^{\circ}\text{C}$ قرار گرفته تا کاملاً ذغال گردد. سپس کروزه را از کوره خارج کرده، تا خنک شود. به آن ۴mL اسید کلریدریک رقیق افزوده، کروزه را روی حمام بخار قرار داده تا حل شود. سپس درب کروزه را برداشته تا روی حمام بخار تبخیر و خشک گردد. باقیمانده را با یک قطره اسید کلریدریک مرطوب نموده و به آن ۱۰mL آب مقطر داغ افزوده تا حل شود. با افزودن محلول آمونیاک، محلول را قلیایی و با آب مقطر تا ۲۵mL رقیق کرده و pH آن بین ۳ و ۴ تنظیم گردید. در صورت نیاز فیلتراسیون نموده و محلول زیر صافی را به یک تیوپ ۵۰mL مقایسه رنگ منتقل و با آب مقطر تا ۴۰mL رقیق گردید. در این مرحله به هریک از محلولهای استاندارد و نمونه، ۱۰mL سولفید هیدروژن تازه تهیه شده افزوده بعد از ۵ دقیقه، رنگ محلولها از بالا به پایین مقایسه گردید. طبق رفرانس FCC، رنگ محلول نمونه نباید از رنگ محلول استاندارد که محتوی 0.004% فلزات سنگین برپایه سرب است، تیره تر باشد (۱۴).

روش اندازه‌گیری فلزات سنگین برپایه سرب: ابتدا دی‌تیزون انجام شده است. ابتدا بایستی محلول استاندارد سرب تهیه شود که هر میلی‌لیتر آن معادل ۱۰ میکروگرم یون سرب باشد (در آزمایش قبل توضیح داده شده است). یون سرب باشد (۱۴).

روش اندازه‌گیری خاکستر تام (Total ash): ۳ گرم از نمونه اسیدآلژینیک تهیه شده را دقیقاً وزن کرده به یک کروزه که قبلاً وزنش تثبیت شده، منتقل گردید. کروزه را در کوره با دمای 650°C (بمدت ۲۰ تا ۳۵ دقیقه) حرارت داده تا احتراق کامل صورت گرفته و بدون کربن شود. سپس کروزه از کوره خارج و در دسیکاتور قرار داده تا پس از رسیدن به دمای محیط، توزین گردد. اختلاف وزن نمونه قبل از احتراق و بعد از احتراق، میزان خاکستر نمونه را نشان می‌دهد که حد مجاز درصد خاکستر طبق رفرانس FCC، حداکثر ۱۵٪ می‌باشد (۱۴).

روش اندازه‌گیری خاکستر سولفات (Sulfated ash): نمونه مشتعل شده و تا زمانی که فقط خاکستر و کربن باقی بماند، سوزانده می‌شود. پس از خنک شدن، باقیمانده با اسید سولفوریک واکنش داده و تا کامل شدن اکسایش کربن، در یک کوره الکتریکی با دمای $775 \pm 25^{\circ}\text{C}$ حرارت داده شد. سپس خاکستر خنک شده، دوباره با اسید سولفوریک واکنش داده و تا رسیدن به وزن ثابت در دمای $775 \pm 25^{\circ}\text{C}$ حرارت داده شد. حد مجاز درصد خاکستر سولفات طبق رفرانس FCC، حداکثر ۸٪ می‌باشد (۱۴).

روش اندازه‌گیری فلزات سنگین برپایه سرب: ابتدا دی‌تیزون انجام شده است. ابتدا بایستی محلول استاندارد سرب تهیه شود که هر میلی‌لیتر آن معادل ۱۰ میکروگرم یون سرب باشد (در آزمایش قبل توضیح داده شده است). یون سرب باشد (۱۴).

روش اندازه‌گیری فلزات سنگین برپایه سرب: ابتدا دی‌تیزون انجام شده است. ابتدا بایستی محلول استاندارد سرب تهیه شود که هر میلی‌لیتر آن معادل ۱۰ میکروگرم یون سرب باشد (در آزمایش قبل توضیح داده شده است). یون سرب باشد (۱۴).

موج 540nm انجام شده است. صفر دستگاه با محلول شاهد تنظیم و جذب محلول نمونه اسید آلزینیک ثبت گردید.

حجم‌هایی از محلول استاندارد آرسنیک که بترتیب دارای جرمی معادل $2/5$ ، 5 ، 10 ، 15 ، 20 میلی گرم آرسنیک است، تهیه کرده و به هریک از آنها 10mL اسید کلریدریک 37% افزوده، حجم محلولها با آب مقطر به 40mL رسید. سپس 2mL محلول یدید پتاسیم 15% و 2mL محلول کلرید قلع اسیدکلریدریکی (40g کلرید قلع دوآبه که در مخلوط 25mL آب مقطر و 75mL اسید کلریدریک حل شده است) به آنها اضافه کرده، همزده شد. سپس منحنی کالیبراسیون محلولهای استاندارد آرسنیک رسم گردیده تا مقدار آرسنیک موجود در نمونه مورد آزمایش مشخص گردد. 10g از نمونه اسید آلزینیک تهیه شده را نیز برداشته و محلولی از آن به همین روش تهیه گردید. طبق رفرنس FCC، حد مجاز آرسنیک حداکثر 3ppm می باشد (۱۴).

روش اندازه گیری درجه خلوص: 250mg اسید آلزینیک تهیه شده را که قبلا در دمای 105°C بمدت ۴ ساعت خشک گردیده بود، به بالن واکنش (D) منتقل و 30mL اسید کلریدریک 1N به آن اضافه شد. بالن به مبرد (F) متصل و سیستم از نظر نشتی نیز کنترل گردید. ابتدا جریان هوای بدون CO_2 بمیزان $3000\text{--}6000\text{mL/h}$ و بمدت ۱۰ دقیقه از دستگاه عبور داده و قطع گردید. حمام روغن (E) در دمای 145°C تنظیم و نمونه داخل بالن واکنش (D) حرارت داده شد، سپس حرارت را قطع کرده تا نمونه خنک شود. 23mL اسید کلریدریک بداخل گیرنده (G) ریخته شد. ستون جذب (L) بسرعت از سیستم جدا شده، 25mL هیدروکسید سدیم 25N و 5 قطره n -جوتانل بداخل آن ریخته، مجددا متصل شد. سپس هوای بدون CO_2 بمیزان 2000mL/h وارد دستگاه و اسیدکلریدریک نیز از طریق گیرنده (G) به بالن واکنش (D) اضافه گردید و حرارت داده شد. بعد از گذشت ۲ ساعت، حرارت دهی و

سپس برای تهیه محلولی از نمونه، 10g از اسید آلزینیک تهیه شده را در یک ظرف شیشه ای ریخته، به آن حداکثر 10mL اسید سولفوریک افزوده و در دمای 120°C حرارت داده شد. در ادامه، هیدروژن پر اکسید 30% اضافه کرده تا ماده آلی آن کاملا از بین برود. دما را نیز تا 30°C - 250 افزایش داده تا بخارات تری اکسید گوگرد خارج گردد و محلول بیرنگ یا زرد کم‌رنگ بماند. سپس آنرا سرد و 10mL آب مقطر به آن اضافه کرده، دوباره تبخیر نموده و به یک دکانتور منتقل و 6mL آمونیم سترات و 2mL هیدروکسیل آمین هیدروکلراید و 2 قطره فنل رد اضافه گردید، که با افزودن آمونیاک غلیظ به آن قلیایی می شود. سپس آنرا سرد نموده، 2mL پتاسیم سیاناید به آن اضافه کرده و بلافاصله با 5mL دی تیزون استخراج و قسمتهای استخراج شده به دکانتور دیگر منتقل گردید. سپس در دکانتور 20mL اسید نیتریک 1% ریخته آنرا تکان داده تا دو فاز تشکیل گردید. لایه کلروفرمی را دور ریخته و به لایه اسیدی 5mL محلول استاندارد دی تیزون و 4mL محلول آمونیاکی سیانید اضافه کرده و تکان داده شد. طبق رفرنس FCC، رنگ قرمز ارغوانی تیره ایجاد شده در محلول کلروفرمی نمونه مربوط به دی تیزونات سرب است که نباید از رنگ محلول شاهد که محتوی حجمی از محلول استاندارد سرب رقیق شده معادل 10ppm سرب است، تجاوز کند (۱۴).

روش اندازه گیری آرسنیک: این تست بطریق رنگ سنجی بادی اتیل دی تیوکاربامات نقره تعیین شده است. آرسنیک بوسیله روی (Zn) در محلول اسید هیدروکلریک، احیاء شده و به آرسین تبدیل می شود. گاز آرسین در محلول دی اتیل دی تیوکاربامات نقره در پیریدین جذب می گردد و رنگ قرمز متمایل به ارغوانی حاصل از ذرات کلوئیدی نقره در حداکثر جذب (طول موج 540nm) ایجاد می شود. اندازه گیری رنگ سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu UV-120-1 در طول

Philips و با تهیه قرص KBr از نمونه‌ها، طیف‌گیری شده است. ۱ mg از نمونه اسید آلزینیک تهیه شده و نمونه استاندارد آن برای تهیه ۱۰۰ mg قرص KBr بدون آب (هر کدام بطور جداگانه) استفاده شد. طیف‌سنجی در دمای اتاق و در محدوده طول موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ انجام گردید. در مجموع ۵۰ اسکن برای هر یک از نمونه‌ها با وضوح 4 cm^{-1} در نظر گرفته شده است.

نتایج

مشخصات فیزیکوشیمیایی اسید آلزینیک: در جدول شماره ۱ شاخصهای کمی و کیفی اسید آلزینیک (گرید غذایی) استخراج شده از فرانس FCC، نشان داده شده که نتایج گرفته شده از نمونه اسید آلزینیک تهیه شده نیز منطبق با مشخصات مندرج در این جدول بدست آمده است.

جریان هوا قطع گردید. سپس باقیمانده هیدروکسید سدیم موجود در ستون جذب (L) را سه بار و هر بار با ۱۵ mL آب مقطر شسته و محلول شستشو با استفاده از هوای بدون CO_2 بدون ارنلن مایر (K) منتقل گردید. در ادامه ارنلن مایر (K) را برداشته، ۱۰ mL محلول کلرورباریم ۱۰٪ در آن ریخته و بآرامی تکان داده شد. بعد فتل فتالین به آن افزوده و با محلول اسید کلریدریک ۰/۱N تیترو گردید. هر میلی لیتر محلول ۰/۲۵N سود مصرف شده در این بخش معادل ۵/۵ mg دی اکسید کربن است. مقدار ۲۰٪ دی اکسید کربن معادل ۹۱٪ اسید آلزینیک در نمونه است (۱۴). بطور همزمان آزمایش شاهد نیز به همین روش انجام شده است.

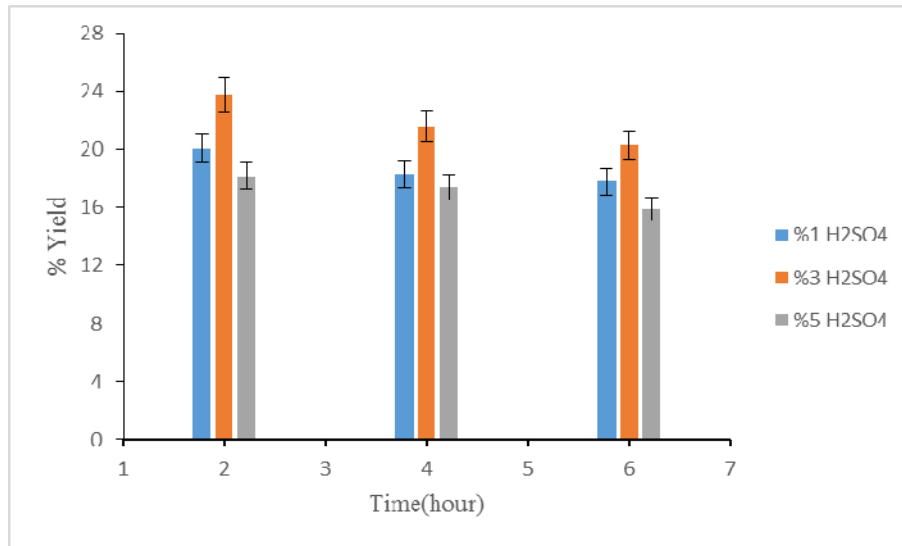
روش تجزیه دستگاهی با FTIR: از این روش طیف‌سنجی برای تعیین گروههای عاملی که در اسید آلزینیک حضور دارند، استفاده شده است. این آزمون با استفاده از دستگاه Pu 9624 FTIR Spectrometer از شرکت

جدول ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی اسید آلزینیک

ردیف	نوع آزمایشات	ویژگیها
۱-	حلالیت	در آب و حلالهای آلی نامحلول، در محلولهای قلیایی بسهولت حل میگردد
۲-	pH	۲-۳/۴ (سوسپانسیون ۳٪ آن در آب)
۳-	آزمایش با کلرورکلسیم TS	ایجاد رسوب حجیم ژلاتینی
۴-	آزمایش با اسیدسولفوریک رقیق TS	ایجاد رسوب توده ای متراکم ژلاتینی
۵-	آزمایش با رزورسینول	ایجاد رنگ بنفش
۶-	میزان خلوص اسید آلزینیک	حداقل ۹۱٪
۷-	میزان خاکستر	حداکثر ۴٪
۸-	میزان خاکستر سولفات	حداکثر ۸٪
۹-	میزان کاهش وزن پس از خشک کردن	حداکثر ۱۵٪
۱۰-	میزان فلزات سنگین برحسب Pb	حداکثر ۰/۰۰۴٪
۱۱-	میزان سرب	حداکثر ۱۰ ppm
۱۲-	میزان آرسنیک	حداکثر ۳ ppm

بازدهی (۲۳/۸٪) را داشته، درحالیکه افزایش زمان (۶ ساعت) و غلظت اسید مصرفی (۵٪) با کمترین بازدهی (۱۵/۹٪)، کاهش تقریباً ۸٪ را نشان داده است.

نتایج مربوط به آزمایشات بهینه سازی شستشوی اسیدی: همانطورکه در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌گردد در این مرحله غلظت ۳٪ اسید مصرفی و زمان ۲ ساعت بیشترین

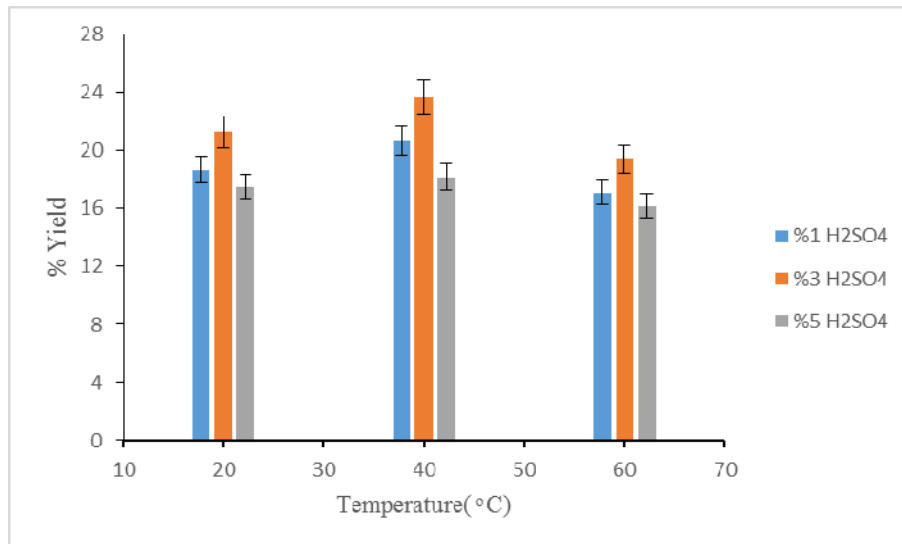


نمودار ۱- اثر زمان و غلظت اسید بر بازده اسید آلزینیک

معناداری با $p\text{-value} < 0.05$

همانطور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌گردد، در این مرحله غلظت ۳٪ اسید مصرفی و دمای 40°C بالاترین بازدهی (۲۳٪) را نشان داده، درحالی‌که افزایش دما ($^{\circ}\text{C}$)

۶۰) و غلظت اسید مصرفی (۵٪) با پایین‌ترین بازدهی (۱۶٪) کاهش ۷/۵٪ را داشته است.



نمودار ۲- اثر دما و غلظت اسید بر بازده اسید آلزینیک

معناداری با $p\text{-value} < 0.05$

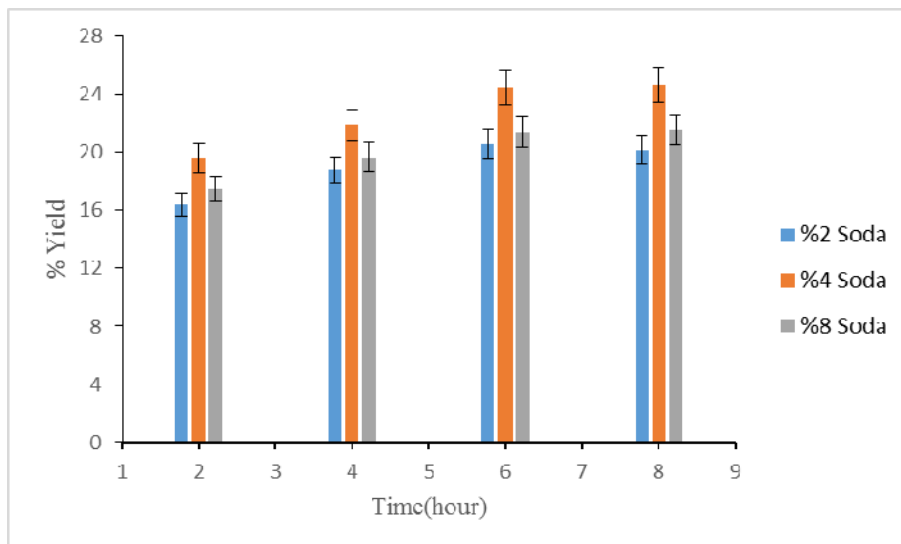
نتیجه نهایی اینکه شرایط محیطی بهینه در این مرحله با غلظت ۳٪ اسید مصرفی، زمان ۲ ساعت و دمای 40°C ساعت مشخص شده است. این در حالی است که هم افزایش همزمان دما و غلظت اسید و هم افزایش همزمان

زمان و غلظت اسید، هر دو اثر منفی بر بازده اسید آلزینیک نشان داده است.

نتایج مربوط به آزمایشات بهینه‌سازی هضم یا استخراج قلیایی: همانطور که در نمودار شماره ۳ مشاهده می‌گردد،

در این مرحله تا غلظت ۴٪ قلیای مصرفی و تا زمان ۶ ساعت بالاترین بازدهی (۲۴٪/۴۸) را نشان داده، درحالیکه افزایش بیشتر زمان (۸ ساعت) و غلظت قلیای مصرفی

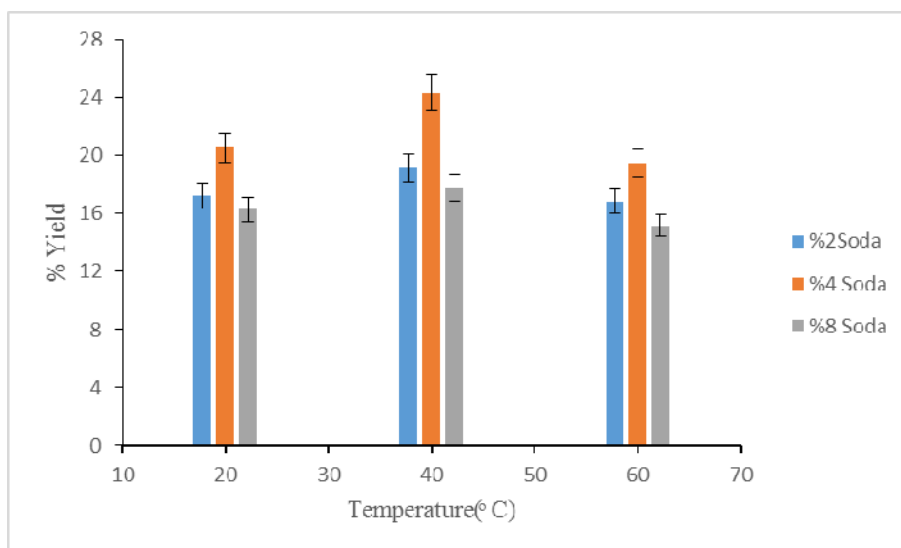
تاثیر چندانی بر افزایش بازدهی (۲۴٪/۶۷) نداشته است.



نمودار ۳- اثر زمان و غلظت قلیا بر بازده اسیدآلژینیک
معناداری با $p\text{-value} < 0.05$

و غلظت قلیای مصرفی (۸٪) با کمترین بازدهی (۱۵٪/۲)، کاهش تقریباً ۹٪ را نشان داده است.

همانطور که در نمودار شماره ۴ مشاهده می گردد، در این مرحله غلظت ۴٪ قلیای مصرفی و دمای 40°C بیشترین بازدهی (۲۴٪/۳۶) را داشته، درحالیکه افزایش دما (60°C)



نمودار ۴- اثر دما و غلظت قلیا بر بازده اسیدآلژینیک
معناداری با $p\text{-value} < 0.05$

گرفته شده از آزمایشات انجام شده بر روی نمونه اسید آلژینیک تهیه شده (جدول شماره ۲) نشان داده است که درصد کاهش وزن پس از خشک کردن با میانگین $13/2\%$ (با حد مجاز حداکثر 15%)، درصد خاکستر تام با میانگین $3/13\%$ (با حد مجاز حداکثر 4%) و درصد خاکستر سولفات با میانگین $7/33\%$ (با حد مجاز حداکثر 8%)، همگی کمتر از حد مجاز تعیین شده (جدول شماره ۱)، می‌باشند.

نتیجه نهایی اینکه شرایط محیطی بهینه در این مرحله با غلظت 4% قلیای مصرفی، زمان ۶ ساعت و دمای 40°C مشخص شده است. این در حالی است که افزایش بیشتر زمان و غلظت قلیا بطور همزمان تاثیر چندانی بر بازدهی اسید آلژینیک را نشان نداده، اما افزایش همزمان دما و غلظت قلیا اثر منفی بر بازدهی آن داشته است.

نتایج مربوط به اندازه گیری میزان کاهش وزن پس از خشک شدن، خاکستر تام و خاکستر سولفات: نتایج

جدول ۲- نتایج اندازه گیری میزان کاهش وزن پس از خشک شدن، خاکستر و خاکستر سولفات

ردیف	وزن نمونه	درصد کاهش وزن پس از خشک کردن	میانگین
۱-	آزمایش اول (۱/۱۲۴g)	$13/6 \pm 0/18$	
۲-	آزمایش دوم (۱/۱۲۱g)	$13/2 \pm 0/14$	$13/2$
۳-	آزمایش سوم (۱/۱۱۸g)	$12/8 \pm 0/12$	
ردیف	وزن نمونه	درصد خاکستر تام	میانگین
۱-	آزمایش اول (۳/۱۱۴g)	$3/5 \pm 0/15$	
۲-	آزمایش دوم (۳/۱۰۸g)	$3/2 \pm 0/13$	$3/13$
۳-	آزمایش سوم (۳/۱۰۳g)	$2/7 \pm 0/11$	
ردیف	وزن نمونه	درصد خاکستر سولفات	میانگین
۱-	آزمایش اول (۳/۱۴۱g)	$7/4 \pm 0/19$	
۲-	آزمایش دوم (۳/۱۳۲g)	$6/9 \pm 0/16$	$7/33$
۳-	آزمایش سوم (۳/۱۵۴g)	$7/7 \pm 0/23$	

شده با میانگین $2/53\text{ppm}$ ، کمتر از حد مجاز تعیین شده (جدول شماره ۱)، می‌باشد.

نتایج مربوط به اندازه گیری خلوص: نتایج جدول شماره ۴ نشان می‌دهد که درصد خلوص نمونه اسید آلژینیک تهیه شده با میانگین $93/57\%$ ، از حداقل خلوص تعیین شده (جدول شماره ۱)، بیشتر می‌باشد.

نتایج مربوط به راندمان محصول: همانطور که نتایج در جدول شماره ۵ نشان می‌دهد روش کلسیفیکاسیون حدود 8% از راندمان محصول بالاتری نسبت به روش اسیدیفیکاسیون برخوردار است.

نتایج مربوط به طیف سنجی FTIR: نتایج طیف سنجی برای هر دو نمونه اسید آلژینیک استخراج شده از

نتایج مربوط به اندازه گیری فلزات سنگین بر حسب Pb: رنگ محلول نمونه اسید آلژینیک تهیه شده روشن تر از نمونه استاندارد آن (محتوی $0/04\%$ سرب) مشاهده گردید که کمتر از حد مجاز تعیین شده (جدول شماره ۱)، می‌باشد.

نتایج مربوط به اندازه گیری سرب: رنگ قرمز ارغوانی محلول نمونه اسید آلژینیک تهیه شده روشن تر از نمونه استاندارد آن (محتوی 10ppm سرب) مشاهده شد که کمتر از حد مجاز تعیین شده (جدول شماره ۱)، می‌باشد.

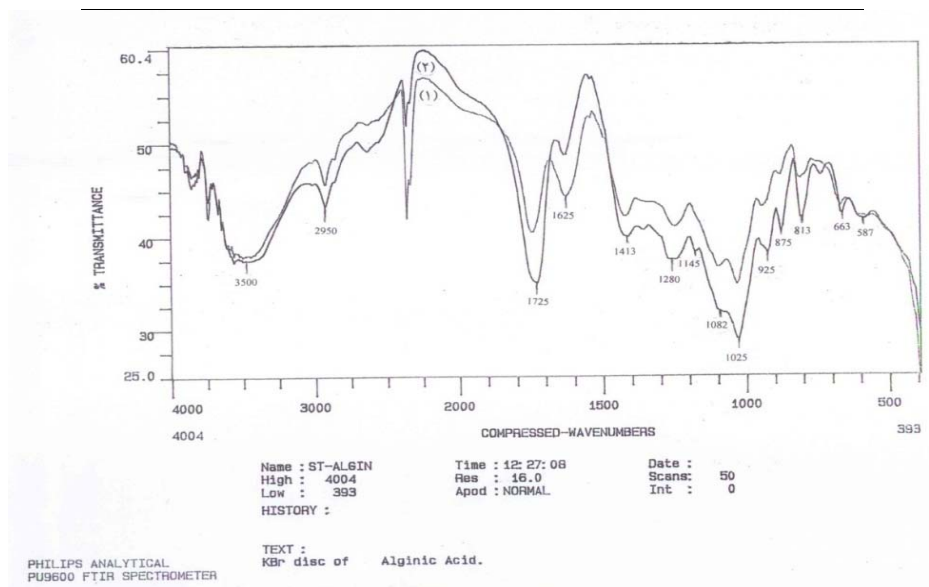
نتایج مربوط به اندازه گیری آرسنیک: نتایج جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که میزان آرسنیک نمونه اسید آلژینیک تهیه

جلبک *Sargassum sp.* و نمونه استاندارد در شکل شماره ۱ نشان داده شده و مشخصات باندها در محدوده cm^{-1} ۱۴۰۰-۳۶۰۰ در جدول شماره ۶ بصورت خلاصه آورده شده است.

جدول ۳- نتایج اندازه‌گیری آرسنیک				جدول ۴- نتایج اندازه‌گیری میزان خلوص			
ردیف	وزن نمونه	میزان آرسنیک	میانگین	ردیف	وزن نمونه	درصد خلوص	میانگین
۱-	آزمایش اول (۱۰/۱۵۲g)	۲/۷ ppm		۱-	آزمایش اول (۲۵۰/۴mg)	۹۲/۵±۰/۲۱	
۲-	آزمایش دوم (۱۰/۱۴۵g)	۲/۵ ppm	۵۳ppm	۲-	آزمایش دوم (۲۴۹/۶mg)	۹۳/۸±۰/۲۴	
۳-	آزمایش سوم (۱۰/۱۲۳g)	۲/۴ ppm	۲	۳-	آزمایش سوم (۲۴۹/۹mg)	۹۴/۴±۰/۱۸	

جدول ۵- نتایج مربوط به راندمان محصول (اسید آلژینیک)			
ردیف	وزن نمونه	راندمان (با روش کلسیفیکاسیون)	میانگین
۱-	آزمایش اول (۱۰۰/۶۲۸g)	۲۵/۲±۰/۳۱	
۲-	آزمایش دوم (۱۰۰/۵۴۳g)	۲۳/۸±۰/۲۲	۲۴/۵
۳-	آزمایش سوم (۱۰۰/۴۷۵g)	۲۴/۶±۰/۳۴	
ردیف	وزن نمونه	راندمان (با روش اسیدیفیکاسیون)	میانگین
۱-	آزمایش اول (۱۰۰/۵۲۸g)	۱۶/۲±۰/۲۸	
۲-	آزمایش دوم (۱۰۰/۷۵۴g)	۱۷/۶±۰/۴۲	۱۶/۸۷
۳-	آزمایش سوم (۱۰۰/۶۴۳g)	۱۶/۸±۰/۳۳	

جدول شماره ۶- مشخصات باندهای اسید آلژینیک گرفته شده از طیف FT-IR	
وظایف	باندها
ارتعاشات کششی باند هیدروژندار O-H	باند پهن متمرکز شده در 3500cm^{-1}
ارتعاشات کششی C-H	سیگنال ضعیف در 2950cm^{-1}
ارتعاشات کششی نامتقارن کربوکسیلات O-C-O	باند شدید در 1625cm^{-1}
ارتعاشات کششی متقارن گروه کربوکسیلات	باند شدید در 1413cm^{-1}



شکل ۱- طیف FT-IR. (۱) نمونه اسید آلژینیک تهیه شده، (۲) نمونه اسید آلژینیک استاندارد

بحث

Padina sp. و *echinocarpum* انجام شده بازده استخراج ۳۰/۵-۱۶/۹٪، همچنین در مطالعه ای که توسط Davis و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بر روی جلبکهای قهوه ای *Sargassum fluitans* و *Sargassum oligocystum* انجام شده، بازده استخراج بترتیب ۲۴/۵-۲۱٪ و ۲۰/۵-۱۶/۳٪ گزارش گردیده (۴۱، ۲۹ و ۷) که همه این نتایج، مطابقت با نتایج گرفته شده از روش کلسیفیکاسیون انجام شده در این تحقیق را (میانگین ۲۴/۵٪) نشان داده است.

دما، غلظت و زمان از جمله پارامترهای تاثیرگذار بر بازده فرآیند استخراج است که در این تحقیق به آن پرداخته شده، بطوریکه دمای ۴۰°C در هر دو مرحله شستشوی اسیدی و هضم قلیائی (نمودار های شماره ۲ و ۴)، غلظت ۳٪ اسید مصرفی و زمان ۲ ساعت در مرحله شستشوی اسیدی (نمودار شماره ۱)، غلظت ۴٪ قلیای مصرفی و زمان ۶ ساعت در مرحله هضم قلیائی (نمودار شماره ۳)، بالاترین تاثیر را بر راندمان استخراج اسید آلزینیک داشته و بهترین شرایط جهت فرآیند استخراج می باشند. همانطور که نتایج نشان داده افزایش دما تا ۴۰°C (نمودار شماره ۴) موجب افزایش برخورد مولکولها با یکدیگر و نتیجتا افزایش نفوذ حلال شده که منجر به بالارفتن بازده استخراج گردیده است. درحالیکه افزایش بیشتر دما، کاهش بازده استخراج را در پی داشته که می تواند بدلیل تخریب در ساختار فضایی زنجیره های اسید آلزینیک ناشی از گسستن پیوند های هیدروژنی صورت گرفته باشد. ساختار سه بعدی مولکولهای کربوهیدرات بستگی به همان اصول ساختمان پلی پپتیدی دارد، زیرا واحدهای با ساختمان کم و بیش محکم حاصل از پیوندهای کووالان ساختمان های ماکرومولکولی سه بعدی ایجاد می نمایند که توسط واکنشهای متقابل ضعیف پایدار می گردند. بعلت وجود تعداد بسیار زیاد گروههای هیدروکسیل در پلی ساکاریدها، ایجاد اتصالات هیدروژنی دارای اثرات مهمی بر روی ساختمان آنها می باشد (۱۲ و ۳۱). مطابق با نتایج، عملیات مقدماتی اسیدی کردن جلبک در طی ۲ ساعت و با یک

همانطور که نتایج نشان داده تفاوت قابل ملاحظه ای در بازده روشهای استخراج مشاهده شده (جدول شماره ۵)، بطوریکه راندمان روش کلسیفیکاسیون (روش اول) با میانگین ۲۴/۵٪، حدود ۸٪ بالاتر از روش اسیدیفیکاسیون (روش دوم) با میانگین ۱۶/۸۷٪ است. بنظر می رسد این افزایش ناشی از تفاوت در جداسازیهای فیزیکی انجام شده در هر دو روش باشد، بطوریکه رسوب آلزینات کلسیم بشکل فیبری براحتی هم قابل جداسازی بوده و هم قابل تبدیل به اسید آلزینیک می باشد، که هنوز در فرم فیبری قرار دارد. مضافا اینکه آگیری از اسید آلزینیک که بشکل فیبری (محصول روش اول) می باشد در مقایسه با شکل ژلاتینی آن (محصول روش دوم) راحتتر انجام می گردد. این مسئله بخصوص در مقیاس صنعتی، انجام فرآیند تولید و بازده محصول نقش تعیین کننده داشته و از نظر توجیه اقتصادی نیز بسیار حائز اهمیت می باشد. اگر چه روش دوم در انجام یک مرحله که تشکیل آلزینات کلسیم است، صرفه جوئی نموده ولی این روش معایب زیر را دارد: اولاً زمانیکه اسید آلزینیک در این فرآیند رسوب می کند بشکل یک رسوب ژلاتینی می باشد که جداسازی آن بسیار مشکل خواهد بود. ثانياً افت نهایی اسید آلزینیک در این روش نسبت به روش اول حدود ۸٪ را نشان داده است و محتوای آب حتی در ژل اسیدی آگیری شده، بالا می باشد. لذا بناچار برای تبدیل محصول به آلزینات سدیم، بایستی از حلال استفاده گردد که این امر فرآیند تولید را گران و احتمالا غیر اقتصادی نموده و بازیافت حلال نیز اجتناب ناپذیر خواهد بود. در مطالعاتی که توسط Nallamuthu و Viswanathan در سال ۲۰۱۴ بر روی جلبکهای قهوه ای *Chnoosporaimplexa* و *Lobophora variegata* انجام شده بازده استخراج بترتیب ۲۹/۱۵٪ و ۲۷/۵۷٪، در مطالعه دیگری که توسط Mushollaeni در سال ۲۰۱۱ بر روی جلبکهای قهوه ای *Sargassum crassifolium*، *Sargassum polycystum*، *Sargassum*

۲۵ به C ۶۰° و زمان استخراج از یک ساعت به ۵ ساعت، راندمان بمیزان ۴۰٪ افزایش داشته است (۲۵). البته پارامترهای دیگری نیز همچون گونه، سن، مراحل رشد جلبک و زیستگاه آن وجود دارند که بر راندمان استخراج تاثیرگذار بوده و قابل پژوهش هستند.

مقدار آب موجود در اسید آلژینیک تاثیرپذیر از حضور اتانول در فرآیند استخراج می باشد. چون اتانول توانایی پیوند با آب موجود در محلول آلژینات را داشته و لذا می تواند باعث کاهش مقدار آب آلژینات گردد (۱۵). در این تحقیق میانگین مقدار آب موجود در اسید آلژینیک استخراج شده از جلبک قهوه ای *Sargassum sp.* برابر با ۱۳/۴٪ بدست آمده و در محدوده تعیین شده طبق رفرنس FCC است. این نتایج در مقایسه با نتایج گرفته شده توسط Parthiban و همکارانش که در سال ۲۰۱۳ از جلبکهای قهوه ای *Sargassum tenerrium*، *Padina boergeseni* و *Dictyota dichotoma* بترتیب برابر ۲۰/۹۴٪، ۱۹/۶۸٪، ۱۶/۴۱٪ و توسط Viswanathan و Nallamuthu در سال ۲۰۱۴ از جلبکهای قهوه ای *Chnoospora implexa* و *Lobophora variegata* بترتیب برابر ۲۸/۳۵٪ و ۲۴/۱۰٪ و نیز توسط Pasanda & Azis در سال ۲۰۱۸ از جلبک قهوه ای *Sargassum sp.* برابر ۲۳/۳۰٪-۲۰/۳۷٪ گزارش شده، بمراتب از میزان کمتری برخوردار بوده و نشاندهنده افزایش خلوص نمونه اسید آلژینیک (بعنوان گرید غذایی) تهیه شده در این تحقیق می باشد (۳۰، ۳۹ و ۳۱). همچنین در مطالعات انجام شده توسط Mushollaeni در سال ۲۰۱۱ بر روی میانگین مقدار آب موجود در اسید آلژینیک استخراج شده از جلبکهای قهوه ای *Sargassum crassifolium*، *Sargassum polycystum*، *Sargassum echinocarpum*، *Padina sp.* و ۱۲/۷٪ و مطالعاتی که توسط Vasuki و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی جلبک قهوه ای *Turbinaria decurrens*، ۱۲/۰۶٪ گزارش شده (۲۹ و ۳۸) که به نتایج ما نزدیک می باشد.

اسید معدنی با غلظت ۳٪، منجر به استخراج موثرتر و نتیجتاً افزایش راندمان محصول گردیده است که علت آن به حذف ترکیبات فنلیک موجود در جلبک نسبت داده می شود. اما افزایش بیشتر زمان و غلظت اسید در این مرحله بر روی کاهش راندمان استخراج تاثیرگذار بوده که می تواند بدلیل احتمال هیدرولیز زنجیره های اسید آلژینیک باشد. همچنین نتایج نشان داده که افزایش زمان هضم قلیائی تا ۶ ساعت و غلظت تا ۴٪ قلیا موجب افزایش راندمان استخراج گردیده، ولی افزایش بیشتر زمان و غلظت قلیا تاثیر چندانی بر افزایش راندمان نداشته است که می تواند ناشی از تعادل در فرآیند واکنشهای تعویض کاتیونها باشد که بصورت تغییر از نمک نامحلول به نمک محلول پلی آمیونی، در محیط واکنش ایجاد می گردد. در این راستا، در مطالعات انجام شده توسط Fertah و همکارانش در سال ۲۰۱۷ که استخراج از جلبک قهوه ای *Moroccan laminaria* در سه دمای C ۴۰، ۶۰ و ۲۵ انجام شده، دمای بهینه C ۴۰ گزارش شده و همانند نتایج این تحقیق، بازده استخراج در این دما بالاترین میزان را نشان داده است (۱۲). در گزارشی که توسط Pasanda و Azis در سال ۲۰۱۸ بر روی استخراج از جلبک قهوه ای *Sargassum sp.* در دو دمای C ۶۰ و ۵۰ و سه زمان استخراج ۵، ۶ و ۷ ساعت انجام شده، بازده استخراج با افزایش دما و زمان روندی افزایشی داشته، بطوریکه در دمای C ۵۰ با افزایش زمان استخراج، بازده از ۲/۷۸٪ به ۹/۱۸٪ افزایش پیدا کرده و این روند در دمای C ۶۰، افزایش قابل توجهی یافته و از ۲۱/۷۳٪ به ۳۲/۴۲٪ رسیده است (۳۱). در یک مطالعه که توسط Vasuki و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی جلبک قهوه ای *Turbinaria decurrens* انجام شده، با افزایش زمان استخراج از یک ساعت به ۵ ساعت، راندمان از ۲۲/۷٪ به ۲۵/۵٪ افزایش یافته است (۳۸). همچنین در گزارش دیگری که توسط Marcia و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی جلبک قهوه ای *Sargassum vulgare* انجام داده اند، با افزایش دما از C ۵۰

مقایسه نتایج گرفته شده از طیف FT-IR نمونه اسید آلژینیک تهیه شده با طیف FT-IR نمونه استاندارد آن مطابقت قابل ملاحظه‌ای را نشان داده است (شکل ۱). مضافاً اینکه این نتایج با نتایجی که توسط Fertah و همکارانش در سال ۲۰۱۷ بر روی آلژینات استخراج شده از جلبک قهوه ای *Vasuki Laminaria digitate* و همکارانش در سال ۲۰۱۵ از جلبک های قهوه ای *Pilar Turbinaria decurrens* و *Eva Gómez-Ordóñez* و *Rupérez* در سال ۲۰۱۱ از جلبکهای قهوه ای *Himanthalia bifurcata*، *Bifurcaria elongate* و *Saccharina latissima*، و *Leal* و همکارانش در سال ۲۰۰۸ از جلبک قهوه ای *Desmarestia ligulata* گزارش شده (۳۸، ۱۲ و ۲۲)، نیز مطابقت دارد. در این طیف سنجی، یک باند پهن در 3500cm^{-1} و دو باند دیگر نیز در 2950cm^{-1} و 1625 وجود دارد که بترتیب به ارتعاشات کششی O-H باند هیدروژن دار، ارتعاشات کششی C-H و ارتعاشات کششی نامتقارن O-C-O کربوکسیلات نسبت داده می شود. یک باند نیز در 1725cm^{-1} وجود دارد که نشاندهنده حضور گروه کربونیل (C=O) می باشد. همچنین با توجه به گزارشات *Vijayaraghavan* و *Shanthakumar*، *Vasuki* و همکارانش در سال ۲۰۱۵، *Singh* و همکارانش در سال ۲۰۱۴، *Fenordosoal* و همکارانش در سال ۲۰۱۰، *Mathlouti* و *Koenig* در سال ۱۹۸۷، جذب در باند 1413cm^{-1} به تغییر شکل ارتعاش C-OH بکمک ارتعاش کششی متقارن O-C-O گروه کربوکسیلات نسبت داده می شود (۴۰، ۳۸، ۳۴، ۱۱ و ۲۶). باند های اندازه گیری شده در 1280cm^{-1} ، 1145 و 1082 نیز ممکن است بترتیب به تغییر شکل C-C-H (و O-C-H)، ارتعاشات کششی C-O و ارتعاشات کششی C-O (و C-C) حلقه های پیرانوز نسبت داده شود. همچنین باند اندازه گیری شده در 1025cm^{-1} ممکن است مربوط به ارتعاشات کششی C-O باشد. ناحیه آتومریک ($950-750\text{cm}^{-1}$) در ارتباط با کربوهیدراتها و پلی ساکاریدهای آلژینات مورد بحث قرار می گیرد. باند

نوع و سن جلبک و نیز شرایط هیدرولوژی و هیدروشیمیایی زیستگاه جلبکها بر مقدار نمک معدنی موجود در آنها و به طبع آن بر میزان خاکستر تام (که نشاندهنده مقدار نمک معدنی در آنها می باشد) تاثیرگذار بوده که در مرحله خالص سازی فرآیند استخراج اسید آلژینیک، قابل پالایش است. در این تحقیق میانگین خاکستر تام اسید آلژینیک استخراج شده از *Sargassum sp.* برابر با $3/13\%$ بدست آمده و در محدوده تعیین شده طبق رفرانس FCC است. نتایج این تحقیق که در مقایسه با نتایج گرفته شده توسط *Nallamuthu* و *Viswanathan* در سال ۲۰۱۴ از جلبکهای قهوه ای *Padina gymnospora*، *Chnoospora implexa* و *Lobophora variegata* بترتیب برابر $23/01\%$ ، $21/53\%$ و $12/78\%$ و توسط *Pasanda & Aziz* در سال ۲۰۱۸ از جلبک قهوه ای *Sargassum sp.* برابر $43/87\%$ - $22/28\%$ گزارش شده (۴۱ و ۳۱)، یک سوم تا یک هشتم کمتر بوده و نشاندهنده افزایش خلوص نمونه اسید آلژینیک (بعنوان گرید غذایی) تهیه شده می باشد. در مطالعاتی که توسط *Vasuki* و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی جلبک قهوه ای *Turbinaria decurrens* میزان خاکستر خام $4/3\%$ گزارش شده (۳۸) که به نتایج ما نزدیک می باشد.

همچنین نتایج گرفته شده از اندازه گیری میزان فلزات سنگین برپایه سرب، سرب و آرسنیک که همگی در محدوده تعیین شده طبق رفرانس FCC بوده است، تایید کننده گرید غذایی نمونه اسید آلژینیک تهیه شده می باشند. علاوه براین سطح کم فلزات سنگین در اسید آلژینیک می تواند نشاندهنده عدم آلودگی آب دریا به عنوان زیستگاه جلبک باشد. در مطالعه ای که توسط *Mushollaeni* جهت اندازه گیری فلزات سنگین سرب و جیوه بر روی آلژینات استخراج شده از جلبکهای قهوه ای *Sargassum crassifolium*، *Sargassum polycystum*، *Sargassum echinocarpum*، و *Padina sp.* انجام شده نیز در محدوده تعیین شده طبق رفرانس FCC گزارش شده است (۲۹).

ساکاریدی طبیعی با کاربردهای متنوع غذایی، دارویی و پزشکی دارند، لذا در این راستا روش استخراج و شرایط محیطی مرتبط با بهینه‌سازی شرایط استخراج که تاثیرگذار بر بازده آن بودند، شناسایی گردید. زمان و دمای بهینه استخراج و غلظت اسید و قلیا مصرفی در فرآیند استخراج، از جمله پارامترهای موثر بر بالارفتن بازده استخراج اسید آلزینیک بعنوان محصول نهایی تشخیص داده شدند. نتایج حاصل از این پژوهش که در افزایش بازده محصول نقش تعیین کننده ای دارد، می تواند در مقیاس صنعتی فرآیند تولید، مفید واقع شود.

در 925cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی C-O بوده که ناشی از حضور اسیداورونیک می باشد (۵ و ۴). سیگنالها در 813 و 875cm^{-1} برتریب به ارتعاش حلقه نامتقارن $\alpha\text{-L-gulopyranuronic}$ و بقایای اسید مانورونیک مربوط می شود (۵، ۳۸ و ۲۶).

نتیجه گیری

هدف از این تحقیق استخراج، شناسایی و خالص سازی اسید آلزینیک با گرید غذایی بوده است. از آنجا که عوامل محیطی اثری تعیین کننده هم بر نوع ترکیبات بیوشیمیایی و هم بر خواص فیزیکیوشیمیایی اسید آلزینیک بعنوان پلی

منابع

- 1- Aseer M., Sugathan S., George S.K., Joseph S., Chippu S., Gandhimathi R., Nataraja, P. M.V. 2009. Biopotentials of seaweeds collected from southwest coast of India, *Journal of Marine Science and Technology*, 17 (1), 67-73.
- 2- Castro, P., Huber, M. 2009. *Maryne Biology*. New York Mc-Graw-Hill Companies Inc.
- 3- Champman, V. J., Champman, D. J. 1980. *Seaweeds and their uses*. 3edition, London-Newyork, 194-225.
- 4- Chandía, N. P., Matsuhira, B., Mejias, E., Moenne, A. 2004. Alginic acids in *Lessonia vadosa*: partial hydrolysis and elicitor properties of the polymannuronic acid fraction. *J. Appl. Phycol.*, 16, 127-133.
- 5- Chandía, N. P., Matsuhira, B., Vásquez, A. E. 2001. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: Characterization By formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydr Polym* 46:81-87.
- 6- Chen, H., Ouyang, W., Jones, M., Hague, T., Lawuyi, B., Prakash, S. 2005. *In-vitro* analysis of APA microcapsules for oral delivery of live bacterial cells. *J. Microencapsulation*, 22 (5), 539-547.
- 7- Davis, T. A., Ramirez, M., Mucci, A., Bjørn Larsen, B. 2004. Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from *Sargassum* spp. *Journal of Applied Phycology*, 16, 275-284.
- 8- Donati, I., Vetere, A., Gamini, A., Skajak-Bræk, G., Coslovi, A., Campa, C., Paoletti, S. 2003. Galactose-Substituted Alginate: Preliminary Characterization and Study of Gelling Properties. *Biomacromolecules* 4 (3), 624-631.
- 9- Draget, K.I., Moe, S.T., Skja B., G., Smidsrød, O. 2006. Alginats. In: *Food Polysaccharides and their Applications*. CRC Press Boca Raton, Florida. 2ed. 14, 159-1178.
- 10- Eva Gómez-Ordóñez, Pilar Rupérez 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*. 25, 1514-1520.
- 11- Fenoradosoa, T. A., Ghina, A., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., Michaud, P. 2010. Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. *J. Appl. Phycol.*, 22, 131-137.
- 12- Fertah, M. Belfkira, A., Dahmane, El-m., Taourirte, M., s Brouillette, F. 2017. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *ArabianJournal of Chemistry*, 10, s3707-14.
- 13- Finotelli, P.V., Da Silva, D., Sola-Penna, M., Rossi, A.M., Farina, M., Andrade, L.R., Takeuchi, A.Y., Rocha-Leaño, M.H., 2010. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. *Colloids Surf. B* 81 (1), 206-211.
- 14- Food Chemical Codex (FCC), 2014-2015. National Academy Press Washington. 9th edition.
- 15- Haryanti, A. M., Darmanti, S., Izzati, M. 2008. Absorption Capacity and Water Storage in

- Various Sizes of Seagrass *Gracilaria verrucosa* as the Base Material of Organic Fertilizer. *Bioma*, 10, 1-6.
- 16- Haug, A., et al., 1967. Correlation between chemical structure and physical properties. *Acta. Chem.Scand*, 21, 768-78.
- 17- Kaladharan P. and Kaliaperumal N. 1999. Seaweed industry in India, *ICLARM Quarterly*, 22(1), 11-14.
- 18- Kaliaperumal N., Kalimuthu S. 1997. Seaweed potential and its exploitation in India, *Seaweed Research Utilisation*, 19(1&2), 33-40.
- 19- Kharkwal H., Joshi D.D., Panthari P., Pant M.K., Kharkwal A.C. 2012. Algae as future drugs, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 1-4.
- 20- Kloareg, B., Quatrano, R.S., 1988. Structure of the cell walls of marine algae and eco-physiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 26, 259-315.
- 21- Laserna, E. C., Veroy, R. L., Luistro, A. H., Montañó, N. E., Cajipe, G. J. B. 1982. Alginic acid from brown seaweeds. *Kalikasan*, Philipp. J. Biol., 11, 51-56.
- 22- Leal, D., Matsuhiro, B., Rossi, M., Caruso, F. 2008. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* 343 (2), 308-316.
- 23- Lee, K.Y., Mooney, D.J. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106-126.
- 24- Maharani, M.A., Widyayanti, R. 2009. Pembuatan alginat dari rumput laut untuk menghasilkan produk dengan rendamen dan viskositas yang tinggi. In: Seminar Tugas Akhir S1 Teknik Kimia UNDIP.
- 25- Marcia, R. T., Alessandra, P. A. S., Eduardo, A. T. S. F., Dirce, F. M., Judith, P. A. F., Regina, C. M. de P., Maria, G. S. L. 2007. Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. *Carbohydrate Research*, 342, 2067-2074.
- 26- Mathlouthi, M., Koenig, J. L. 1987. Vibrational spectra of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 44, 7-89.
- 27- Mc Hugh, D.J. 2003. A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 441. FAO, Rome, 105p.
- 28- Moe, S.T., Draget, K.I., Skjærve, G., Smidsrød, O., 1995. Alginates. In: Stephen, A.M. (Ed.), *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 245-286.
- 29- Mushollaeni W. 2011. The physicochemical characteristics of sodium alginate from Indonesian brown seaweeds. *African J Food Sci.*, 5(6), 349-352.
- 30- Parthiban, C., Saranya, C., Girija, K., Hemalatha, A., Suresh, M., Anantharaman P. 2013. Biochemical composition of some selected seaweeds from Tuticorin coast. *Advances in Applied Science Research*, 4 (3), 362-366.
- 31- Pasanda, O. S. R., Azis, A. 2018. The Extraction of Brown Algae (*Sargassum* sp) Through Calcium Path to Produce Sodium Alginate. *J.B.A.T.*, 7 (1), 64-69.
- 32- Rinaudo, M. 2007. Seaweed polysaccharides. In: Kalmerling JP (ed.) *Comprehensive glycoscience from chemistry to systems biology*, Elsevier, London, 2, 691-735.
- 33- Sabra, W., Deckwer, W.D. 2005. Alginate - a polysaccharide of industrial interest and diverse biological functions. In: Dumitriu S (ed.) *Polysaccharides—structural diversity and functional versatility*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, pp 515-533.
- 34- Singha, P., Singh, S. K., Bajpai, J., Bajpai, A. K., Shrivastava, R. B. 2014. Iron crosslinked alginate as novel nanosorbents for removal of arsenic ions and bacteriological contamination from water. *J. Mater. Res. Technol.*, 3(3), 195-202.
- 35- Stephen, M. 1995. *Food Polysaccharide and Their Applications*. Department of Chemistry. University of Cape Town Rondebosch. South Africa.
- 36- Subaryono, 2010. Modifikasi Alginat Dan Pemanfaatan Produknya. *Squalen*, 5 (1), 1-7.
- 37- Sumera, F., Pepito, M., Corpuz, E. 1992. Sodium alginate from Philippine *Sargassum*: dependence of its Viscosity and yield on seasonality and pretreatment. *Proc. 2nd RP-USA Phycology Symp. Workshop*. Philippine Council for Aquatic and Marine Research and Development, Los Baños, Laguna, 93-101.
- 38- Vasuki, S., Kokilam, G., Babitha, D. 2015. FT-IR, ¹H- & ¹³C- NMR spectroscopy of alginate extracted from *Turbinaria decurrens* (phaeophyta). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(12), 761-771.

- 39- Vauchel P., Kaas R., Arhaliass A., Baron R., Legrand J. 2008. A new process for extracting alginates from *Laminaria digitata* reactive extrusion, *Food and Bioprocess Technology*, 1, 297-300.
- 40- Vijayaraghavan, G., Shanthakumar, S. 2015. Efficacy of alginate extracted from marine brown algae (*Sargassum* sp.) as a coagulant for removal of direct blue2 dye from aqueous solution. *Global NEST Journal*, 17(4), 716-726.
- 41- Viswanathan, S., Nallamuthu, T. 2014. Extraction of Sodium Alginate from Selected Seaweeds and Their Physiochemical and Biochemical Properties. *I.J.I.R.S.E.T.*, 3 (4), 10998-11003.

Extraction and purification of alginic acid from brown algae on the east southern coast of Iran

Abolhasani M.H.

² Dept. of Chemical Technology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Alginic acid is a valuable polysaccharide that is extracted from brown algae and used widely in the food, pharmaceutical, biomedical, cosmetic, textile, dyeing and printing industries as thickeners, emulsifiers, stabilizers and the ability to form gels. Extraction methods and environmental conditions are the factors of the influence on the extraction yield. Evaluation of these agents have particular importance. In this research, alginic acid was extracted using acidification and calcification methods, and were compared with each other. Temperature, concentration and time were evaluated to determine optimal extraction conditions. FTIR spectroscopy was used to identify and compare the alginic acid sample with the standard. The alginic acid sample was analyzed by using the methods provided in food chemicals codex. Based on the results, the extraction yield of alginic acid was increasing 8% by calcification method ratio to the acidification method. Effective parameters have been identified to increase the extraction yield of alginic acid, including the concentration of 3% mineral acid at 2 hours, 4% alkaline concentration at 6 hours and temperature of 40 °C. The results of analysis of alginic acid were with an average purity of 93.57%, total ash 3.13%, loss on drying 13.2%, sulfate ash 7.33%, heavy metals as lead less than 0.004%, lead and arsenic less than 10 ppm and 3 ppm respectively. These results were based on the specified range food chemicals codex, and therefore it was introduced as an alginic acid food grade. The FTIR spectrum from alginic acid sample showed in according to its standard sample.

Key words: *Sargassum* sp. brown algae, Alginic acid, Extraction methods, Calcification, Acidification