

## (OPEN ACCESS)

### Green Extraction of Pectin from Lime Peeling: Modeling and Optimization Using Response Surface Methodology

Seyedeh Motahareh Mohseni Shektai<sup>1</sup>, Seyed Majid Zabihzadeh<sup>2\*</sup> , Maryam Ghorbani Kokandeh<sup>3</sup> and Ghasem Asadpour<sup>4</sup> 

1-PhD student, Cellulosic Industry, Department of Wood and Cellulosic Products Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran

2\*- Corresponding Author, Associate Professor, Department of Wood and Cellulosic Products Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran, Email: [m.zabihzadeh@sanru.ac.ir](mailto:m.zabihzadeh@sanru.ac.ir)

3-Professor, Department of Wood and Cellulosic Products Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran

4-Associate Professor, Department of Wood and Cellulosic Products Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran

#### Article Info

#### ABSTRACT

##### Article type:

Full Length Research Paper

##### Article history:

Received: 17 November 2025

Revised: 10 December 2025

Accepted: 14 December 2025

Published online: 20 March 2026

##### Keywords:

Albedo,  
citric acid,  
lime,  
methodology (RSM),  
optimization,  
pectin,  
response surface,.

**Background and objectives:** Pectin is a multifunctional polysaccharide widely used in the food, pharmaceutical, and packaging industries. Owing to its valuable functional properties, global demand for pectin exceeds 30,000 tons per year, with an annual market growth of approximately 4–5%. Lime peeling (*Citrus aurantifolia*), particularly its inner white layer (albedo), is rich in pectin and represents an economical and sustainable raw material for pectin production. Utilizing this agro-industrial by-product not only provides added economic value but also contributes to reducing the environmental impacts associated with waste disposal. Conventional pectin extraction methods rely on mineral acids, which, despite ensuring high extraction yields, are associated with elevated production costs and environmental concerns. In contrast, organic acids such as citric acid function as green solvents, providing desirable yields while minimizing adverse environmental effects. Accordingly, the present study aimed to optimize acid extraction of pectin from lime peeling to achieve maximum yield and desirable quality characteristics, including high purity and adjustable degree of methoxylation.

**Methodology:** Lime albedo was separated from fresh fruit, washed, chopped, and dried at 50 °C to a constant weight, then ground and passed through a 20-mesh sieve. For acid extraction, 10 g of albedo powder was mixed with an aqueous citric acid solution at a fixed liquid-to-solid ratio of 30:1 (v/w) under three pH levels (1, 2, and 3). The resulting suspension was subjected to extraction at temperatures of 65, 80, and 95 °C and for extraction times of 30, 60, and 90 minutes. After centrifugation, pectin was precipitated using absolute ethanol, washed with 96% ethanol, dried at 40 °C, and subsequently powdered. A Box–Behnken experimental design was employed with three independent variables (temperature, time, and pH) at three levels, comprising 15 experimental runs. Extraction yield was calculated gravimetrically;

galacturonic acid content (GalA) was determined by a colorimetric method using the m-hydroxydiphenyl reagent with absorbance measured at 520 nm; and degree of esterification (DE) was quantified via a two-step titration method (neutralization and saponification). Data were fitted to a second-order polynomial model using Design Expert version 13, and the optimal model was selected based on analysis of variance (ANOVA), coefficient of determination ( $R^2$ ), adjusted  $R^2$ , and lack-of-fit tests.

**Results:** The pectin extraction yield was significantly influenced by the processing conditions and varied between 8.21% and 53.8%. The highest yield was obtained at 80 °C, 90 minutes, and pH 1, whereas the lowest yield occurred at pH 3 under lower temperature conditions. The degree of esterification (DE) also showed a clear dependency on extraction parameters; the highest DE value (61.11%) was achieved under milder conditions (80 °C, 30 minutes, pH 3), indicating the production of high-methoxyl pectin. In contrast, more severe extraction conditions such as pH 1 combined with prolonged extraction time led to a marked reduction in DE to approximately 9.13%, resulting in low-methoxyl pectin. Galacturonic acid content was similarly affected by extraction severity; the highest purity (87.83%) was observed at pH 3, 30 minutes, and 80 °C, while significantly lower purity values were recorded under highly acidic conditions. The regression models developed for yield, DE, and GalA exhibited excellent statistical performance, with coefficients of determination ( $R^2$ ) exceeding 0.98, confirming the high accuracy and predictive capability of the models in describing the extraction system.

**Conclusion:** The findings of this study confirm the effectiveness of citric acid as a green and environmentally friendly solvent for extracting pectin from lime peel. Under optimized conditions, pectin with high yield, high purity, and an adjustable degree of esterification was successfully obtained. The application of response surface methodology enabled precise modeling of the extraction process, and the close agreement between predicted and experimental values demonstrated the strong validity and reliability of the developed model. Given its high purity and tunable methoxyl content, the extracted pectin is suitable for a wide range of applications in the food, pharmaceutical, and bio-based packaging industries. Utilizing lime peel - an abundant by-product of the lime juice industry - as a raw material not only provides a valuable source for pectin production but also contributes to sustainable development, agricultural waste management, and the reduction of environmental impacts. This approach offers an effective strategy for converting plant-based waste materials into value-added products within related industries.

**Cite this article:** Seyedeh Motahareh Mohseni Shektai, Seyed Majid Zabihzadeh, Maryam Ghorbani Kokandeh and Ghasem Asadpour. 2026. Green Extraction of Pectin from Lime Peeling: Modeling and Optimization Using Response Surface Methodology. Iranian Journal of Wood and Paper Science Research, 41(1), 46-68. DOI: <https://doi.org/10.22092/ijwpr.2025.371455.1820>

## استخراج سبزی پکتین از پوست لیموترش: مدل سازی و بهینه سازی با روش سطح پاسخ

سیده مطهره محسنی شکنتائی<sup>۱</sup>، سید مجید ذبیح زاده<sup>۲\*</sup> ID، مریم قربانی کوکنده<sup>۳</sup> و قاسم اسدپور<sup>۴</sup> ID

۱- دانشجوی دکتری رشته صنایع سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه چوب و فراورده های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

پست الکترونیک [m.zabihzadeh@sanru.ac.ir](mailto:m.zabihzadeh@sanru.ac.ir)

۳- استاد، گروه چوب و فراورده های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۴- دانشیار، گروه چوب و فراورده های سلولزی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

| اطلاعات مقاله  | چکیده   |
|--|---|
| نوع مقاله:<br>کامل علمی - پژوهشی   | سابقه و هدف: پکتین پلی ساکاریدی چندمنظوره است که کاربرد گسترده ای در صنایع غذایی، دارویی و بسته بندی دارد. به دلیل ویژگی های عملکردی ارزشمند، تقاضای جهانی آن بیش از ۳۰ هزار تن در سال برآورد شده و بازار آن سالانه حدود ۴ تا ۵ درصد رشد می کند. پوست لیموترش ( <i>Citrus aurantifolia</i> )، بخش سفید داخلی (آلبیدو) غنی از پکتین است و می تواند منبعی اقتصادی و پایدار برای تولید پکتین باشد. بهره برداری از این ضایعات علاوه بر ایجاد ارزش افزوده، به کاهش آثار زیست محیطی ناشی از دفع پسماند کمک می کند. روش های مرسوم استخراج پکتین مبتنی بر اسیدهای معدنی، اگرچه بازده بالایی فراهم می کنند، اما هزینه بالا و چالش های زیست محیطی را به همراه دارند. در مقابل، اسیدهای آلی مانند سیتریک اسید به عنوان حلال های سبزی می توانند بازده مطلوبی همراه با کاهش آثار منفی ارائه دهند. بر این اساس، این پژوهش باهدف بهینه سازی استخراج اسیدی پکتین از پوست لیموترش برای دستیابی به بیشینه بازده و کیفیت مناسب، شامل خلوص بالا و قابلیت تنظیم درجه متوکسیل انجام شد.   |
| تاریخ های مقاله:<br>تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۶<br>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۱۹<br>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳<br>تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۲/۲۹ | مواد و روش ها: آلبیدوی لیموترش پس از جداسازی از میوه تازه، شست و شو، خرد شدن و خشک کردن در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد تا رسیدن به وزن ثابت، آسیاب شده و از الک با مش ۲۰ عبور داده شد. برای استخراج اسیدی، ۱۰ گرم از پودر آلبیدو با نسبت ثابت مایع به جامد ۳۰:۱ (حجمی/وزنی) در محلول آبی سیتریک اسید با سه سطح pH شامل ۱، ۲ و ۳ مخلوط شد و سوسپانسیون حاصل در دماهای ۶۵، ۸۰ و ۹۵ درجه سانتی گراد و زمان های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه استخراج گردید. پس از سانتریفیوژ، پکتین با اتانول مطلق رسوب داده شد، سپس با اتانول ۹۶ درصد شست و شو و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد خشک و بعد پودر شد. طرح آزمایشی باکس-بنکن با سه عامل (دما، زمان و pH) در سه سطح و شامل ۱۵ تیمار طراحی شد. بازده استخراج براساس روش توزین محاسبه شد، آنگاه محتوای گالاکتورونیک اسید (Gala) با روش رنگ سنجی مبتنی بر معرف متاهیدروکسی دی فنیل و قرائت جذب در ۵۲۰ نانومتر و درجه استری شدن به روش تیتراسنجی دو مرحله ای (خنثی سازی و صابونی سازی) تعیین گردید. داده ها با مدل چندجمله ای درجه دوم در نرم افزار Design Expert نسخه ۱۳ برازش شدند و مدل مناسب بر اساس آنالیز واریانس، ضریب تبیین، ضریب تبیین تعدیل شده و آزمون عدم برازش انتخاب شد. |
| واژه های کلیدی:<br>آلبیدو،<br>بهینه سازی<br>پکتین،<br>روش سطح پاسخ،<br>سیتریک اسید،<br>لیموترش.                                  | نتایج: بازده استخراج پکتین به طور معنی داری تحت تأثیر شرایط فرایندی قرار گرفت و در محدوده ای بین ۸/۲۱ تا ۵۳/۸ درصد متغیر بود. بیشترین بازده در شرایط دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، زمان ۹۰ دقیقه و pH برابر با ۱ حاصل شد، درحالی که کمترین بازده در pH برابر با ۳ و دمای پایین به دست آمد. درجه استری شدن پکتین نیز وابستگی آشکاری به شرایط استخراج نشان داد؛ به طوری که بیشترین مقدار آن (۶۱/۱۱ درصد) در شرایط ملایم تر   |

دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۰ دقیقه و  $\text{pH}=3$  به دست آمد که معرف تولید پکتین با درجه متوکسیل بالا است. در مقابل، شرایط شدیدتر استخراج مانند  $\text{pH}=1$  همراه با زمان طولانی، سبب کاهش قابل توجه DE تا حدود ۹/۱۳ درصد و تولید پکتین کم متوکسیل شد. میزان گالاکتورونیک اسید نیز تحت تأثیر شدت شرایط استخراج قرار داشت؛ به نحوی که بیشترین خلوص (۸۷/۸۳ درصد) در  $\text{pH}$  برابر با ۳، زمان ۳۰ دقیقه و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، در حالی که در  $\text{pH}$ های پایین، خلوص پکتین کاهش قابل توجهی یافت. مدل‌های رگرسیونی توسعه یافته برای بازده DE و GalA برآزش آماری بسیار مطلوبی داشتند و ضرایب تبیین ( $R^2$ ) بالاتر از ۰/۹۸ مؤید دقت و کارایی مناسب مدل‌ها در توصیف رفتار سیستم استخراج بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش کارآمدی سیتریک اسید را به عنوان یک حلال سبز و سازگار با محیط زیست برای استخراج پکتین از پوست لیموترش تأیید می‌کند. در شرایط بهینه، پکتینی با بازده بالا، خلوص زیاد و درجه استری شده قابل تنظیم حاصل شد. به کارگیری روش سطح پاسخ امکان مدل‌سازی دقیق فرایند استخراج را فراهم کرد و تطابق نزدیک داده‌های پیش‌بینی شده و تجربی، اعتبار بالای مدل را نشان داد. پکتین تولید شده با توجه به خلوص زیاد و قابلیت تنظیم میزان متوکسیل، در کاربردهای گسترده‌ای از جمله صنایع غذایی، دارویی و بسته‌بندی زیست‌پایه قابل استفاده است. استفاده از پوست لیموترش به عنوان یک پسماند فراوان صنایع آلیمو، علاوه بر تأمین منبعی ارزشمند برای تولید پکتین، در راستای توسعه پایدار، مدیریت ضایعات کشاورزی و کاهش اثرهای زیست‌محیطی اهمیت دارد. این رویکرد می‌تواند راهکاری مؤثر برای تبدیل پسماندهای گیاهی به محصولات با ارزش افزوده در صنایع وابسته باشد.

استناد: سیده مطهره محسنی شکنائی، سید مجید ذبیح‌زاده، مریم قربانی کوننده و قاسم اسدیپور. ۱۴۰۵. استخراج سبز پکتین از پوست لیموترش: مدل‌سازی و بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ. نشریه تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران، ۴۱(۱)، ۴۶-۶۸.

DOI: <https://doi.org/10.22092/ijwpr.2025.371455.1820>

## مقدمه

پکتین از چندین نوع پلی‌ساکارید تشکیل شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به هموگالاکتورونان، رامنوگالاکتورونان I و رامنوگالاکتورونان II اشاره کرد؛ همچنین مقادیر کمی زایلوگالاکتورونان نیز در ساختار آن وجود دارد (Dubey et al., 2023; Panahirad et al., 2021). در میان این اجزا، هموگالاکتورونان شایع‌ترین نوع پکتین است و حدود ۵۰ تا ۹۰ درصد از کل پکتین را تشکیل می‌دهد. یکی از ویژگی‌های کلیدی پکتین، درجه متوکسیل (Degree of methoxylation) (DM) است که نقش تعیین‌کننده‌ای در کاربردهای عملکردی آن دارد. DM بر اساس تعداد مول‌های متانول در برابر هر ۱۰۰ مول گالاکتورونیک اسید تعریف می‌شود و به عنوان شاخصی برای تعیین رفتار ژل‌سازی و واکنش‌پذیری پکتین در سامانه‌های غذایی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد

پکتین مجموعه‌ای پیچیده از پلی‌ساکاریدها است که در دیواره‌ی سلولی اولیه و لایه میانی بافت‌های گیاهی حضور دارد و در بیشتر گیاهان حدود یک سوم ماده خشک دیواره سلولی را تشکیل می‌دهد (Gharibzadeh et al., 2019). ساختار پکتین عمدتاً از واحدهای گالاکتورونیک اسید (GalA) تشکیل شده که با پیوندهای  $\alpha(1\rightarrow4)$ ، زنجیره اصلی را ایجاد می‌کنند و قندهای خنثی متصل شده به این زنجیره، بخش‌های جانبی را می‌سازند. بخشی از واحدهای گالاکتورونیک اسید با توجه به منبع گیاهی در موقعیت کربوکسیل C-6 به صورت متیل‌استری شده و گاهی در موقعیت‌های O-2 یا O-3 به صورت O-استیله یافت می‌شوند (Lasunon & Sengkhampan, 2022).

پکتین تجاری عمدتاً از پوست مرکبات، تفاله سیب و چغندر قند استخراج می شود (Hossain et al., 2024). با این حال، به منظور پاسخ گویی به نیاز روبه افزایش بازار و کاهش وابستگی به منابع سنتی، محققان و تولیدکنندگان در پی منابع جایگزین و پایدار هستند. در این راستا، پژوهش های متعددی بر استخراج پکتین از سایر محصولات گیاهی و ضایعات کشاورزی از جمله پوسته کاکائو، پوست شاخه توت، تفاله هلو، دانه آفتابگردان، پوست درخت انبه، پوست هندوانه، ضایعات سیسال، پوست انار و پوست پاپایا انجام شده است (Adetunji et al., 2017).

امروزه پوست میوه های جنس سیتروس (مرکبات) به عنوان اصلی ترین ماده خام در تولید پکتین تجاری مورد استفاده قرار می گیرد. بخش سفید و اسفنجی داخل پوست این میوه ها حاوی بالاترین مقدار پکتین است و بیشترین بازده استخراج پکتین از همین منابع به دست می آید (Ebrahim zadeh & Azadbakht, 2006). لیموترش (*Citrus aurantifolia L*) از خانواده مرکبات است. اگرچه به دلیل طعم ترش و تلخ، مصرف آن به عنوان میوه خوراکی محدود است، اما به طور گسترده به عنوان مکمل دارویی و غذایی کاربرد دارد (Allian et al., 2020). لیموترش از مهم ترین گونه های کشت شده برای مصارف تجاری محسوب می شود و یکی از پرفروش ترین انواع لیمو به ویژه در صنایع فراوری است. پوست لیموترش که محصول جانبی کارخانه های تولید آبلیمو به شمار می آید، اغلب به عنوان خوراک دام مصرف شده یا به عنوان ضایعات دور ریخته می شود. این در حالی است که پوست لیمو منبعی غنی و ارزشمند از پکتین است (Mahmud et al., 2021). از این رو، بهره برداری از آن برای تولید پکتین نه تنها به افزایش ارزش افزوده محصولات جانبی صنایع تولید آب میوه کمک می کند، بلکه در کاهش مشکلات محیط زیستی ناشی از دفع ضایعات نیز نقش مؤثری دارد.

استخراج پکتین از منابع گیاهی فرایند فیزیکی شیمیایی چندمرحله ای است که شامل هیدرولیز تدریجی اجزای دیواره سلولی می شود و در نهایت موجب آزادسازی متوالی

(Hossain et al., 2024).

بر اساس میزان استری شدن (Degree of esterification) (DE)، پکتین ها به دو گروه پکتین های با درجه متوکسیل بالا (High methoxyl pectin) (HM) و پکتین های با درجه متوکسیل پایین (Low methoxyl pectin) (LM) طبقه بندی می شوند. زمانی که بیش از ۵۰٪ از واحدهای گالاکتورونیک اسید (GalA) استری شده باشند، پکتین در گروه HM قرار می گیرد؛ در غیر این صورت، به عنوان پکتین LM شناخته می شود (Chalapud et al., 2023). پکتین های HM در غلظت های بالای قند و در pH پایین قادر به تشکیل ژل هستند، در حالی که پکتین های LM برای ژل سازی به حضور یون های دو ظرفیتی به ویژه یون های کلسیم نیاز دارند. علاوه بر این، گروه های استیل می توانند به صورت تصادفی به زنجیره هموگالاکتورونان متصل شوند و از طریق ایجاد موانع فضایی، بر سازوکار و کارایی ژل سازی تأثیر بگذارند.

پکتین یک افزودنی طبیعی و چندکاربردی است که به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان تغلیظ کننده، بافت دهنده، امولسیون ساز، پایدارکننده و عامل ژل ساز مورد استفاده قرار می گیرد (Martau et al., 2019). علاوه بر این، پکتین در تولید محصولات کم چرب نقش مؤثری داشته و به عنوان جایگزین چربی در فرآورده های قابل پخش و بستنی به کار می رود. در حوزه بسته بندی سبزی نیز به عنوان ماده زمینه برای تولید فیلم ها و پوشش های خوراکی زیست تخریب پذیر کاربرد دارد (Mendes et al., 2020). در صنعت داروسازی، پکتین به دلیل ویژگی های زیستی خود برای کاهش چربی خون، تسکین درد و نیز کاهش بروز بیماری های قلبی و سنگ کیسه صفرا مورد استفاده قرار می گیرد (Eca et al., 2015). به دلیل خواص عملکردی و تغذیه ای ارزشمند پکتین، تقاضای جهانی برای آن سالانه بیش از ۳۰،۰۰۰ تن گزارش شده است و میزان رشد بازار آن حدود ۴ تا ۵ درصد در سال برآورد می شود (Durán-Aranguren et al., 2022).

با سه عامل و سه سطح انجام شد تا ترکیب بهینه شرایط فرایندی تعیین شود.

### مواد و روش‌ها

تهیه نمونه لیموترش

لیموترش (*Citrus aurantifolia L*) از بازار شهر ساری در استان مازندران تهیه شد. میوه‌ها پیش از پوست‌گیری به دقت شست‌وشو شدند تا هرگونه ناخالصی سطحی حذف شود. پس از جداسازی آلبیدو، برای کاهش طعم تلخ ناشی از وجود گلیکوزیدها، قطعات آلبیدو به‌طور کامل با آب شست‌وشو گردیدند. سپس آلبیدوها به قطعات کوچک برش خورده و در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند. برای تهیه پودر آلبیدو، نمونه‌های خشک شده، آسیاب شده و از الک با مش شماره ۲۰ عبور داده شدند. پودر حاصل در کیسه‌های پلی‌اتیلن قرار گرفت و تا زمان انجام آزمایش‌ها در محیطی خشک نگهداری شد (Pei et al., 2024).

### مواد شیمیایی و معرف‌ها

سیتریک اسید، سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید، سولفوریک اسید و معرف فنل‌فتالین از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شدند. همچنین متیل‌استر پلی‌دی‌گالاکتورونیک اسید، متاهیدروکسی‌دی‌فیل و تترابورات سدیم از شرکت سیگما-آلدریج (Sigma-Aldrich) تأمین گردیدند. اتانول مطلق و اتانول ۹۶ درصد نیز از شرکت مجللی ایران خریداری شد.

### طراحی سطح پاسخ و تجزیه و تحلیل آماری

روش سطح پاس (Response Surface (RSM Method) برای تعیین شرایط بهینه استخراج پکتین از پوست لیموترش مورد استفاده قرار گرفت و طرح باکس-بنکن با سه متغیر مستقل استفاده شد. متغیرهای مستقلی که در استخراج اسیدی ارزیابی شدند شامل دمای استخراج ( $X_1$ )، زمان استخراج ( $X_2$ ) و pH ( $X_3$ ) بودند. هر یک از این عوامل

ماکرو مولکول‌های پکتین از بافت گیاه می‌گردد. این فرایند تحت تأثیر مجموعه‌ای از پارامترهای عملیاتی قرار دارد که مهم‌ترین آن‌ها pH، دما و زمان فرایند هستند (Marwa Mahmoud et al., 2022). پکتین در آب محلول است اما در الکل و بسیاری از حلال‌های آلی غیرمحلول است (Pinheiro et al., 2008) است. بر همین اساس، روش‌های سنتی استخراج پکتین متکی بر استخراج در محیط‌های آبی و بعد رسوب‌دهی پکتین با استفاده از حلال‌های آلی می‌باشند. با وجود این، استخراج پکتین تنها با آب دشوار است، زیرا پکتین محکم به ساختار دیواره سلولی متصل است. از این رو، استخراج اسیدی یکی از رایج‌ترین و کارآمدترین روش‌های استخراج پکتین به‌شمار می‌رود (Chan, 2013). در روش‌های مرسوم، استخراج با استفاده از محلول‌های حاوی اسیدهای معدنی مانند سولفوریک، فسفریک و نیتریک اسید آغاز شده و بعد فرایند با رسوب‌دهی الکلی ادامه می‌یابد. با این حال، استفاده از این اسیدها علاوه بر افزایش هزینه‌های تولید، منجر به مشکلات زیست‌محیطی نیز می‌شود. در نتیجه، بهره‌گیری از اسیدهای آلی مانند سیتریک اسید و استیک اسید که می‌توانند بازده مناسب استخراج را فراهم کنند، گزینه‌ای مطلوب برای کاهش هزینه‌ها و کاهش آثار زیست‌محیطی به‌شمار می‌آید (Xu et al., 2019).

در این مطالعه، سیتریک اسید به‌عنوان حلال برای استخراج مورد استفاده قرار گرفت. در فرایند استخراج پکتین از منابع گیاهی، متغیرهای مختلفی از جمله دمای استخراج، زمان و pH بر بازده و کیفیت محصول نهایی تأثیرگذار هستند؛ از این رو، بهینه‌سازی این عوامل برای دستیابی به حداکثر بازده استخراج ضروریست. بر این اساس، هدف این پژوهش بهینه‌سازی شرایط استخراج اسیدی پکتین از پوست لیموترش با تمرکز بر سه شاخص کلیدی شامل بازده استخراج، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید (شاخص خلوص) بود. این بهینه‌سازی با استفاده از طراحی سطح پاس-بنکن (Box Behnken Design) (BBD) انجام شد.

آزمون F برای ارزیابی برازش مدل مرتبه دوم در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  استفاده شد. کفایت مدل با استفاده از شاخص‌هایی مانند عدم برازش (Lack of Fit)، ضریب تعیین ( $R^2$ )، دقت کافی (Adeq-Precision) و مقدار آزمون F حاصل از آنالیز واریانس (ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از آن، ضرایب رگرسیون به منظور تولید سطوح پاسخ و پیش‌بینی رفتار سیستم استخراج استفاده شدند. در نهایت، برای تأیید اعتبار مدل آماری و صحت پیش‌بینی‌ها، آزمایش‌های تأییدی انجام شد.

### استخراج اسیدی

استخراج پکتین از آلبدوی خشک‌شده لیموترش با استفاده از سیتریک اسید و براساس روش [Hosseini](#) و همکاران (۲۰۱۶) با اعمال اصلاحات جزئی انجام شد. بدین منظور، ۱۰ گرم پودر آلبدوی خشک به نسبت ثابت مایع به جامد ۳۰:۱ (حجمی/وزنی) با محلول آبی سیتریک اسید در سه سطح pH شامل ۱، ۲ و ۳ مخلوط گردید. سپس مخلوط‌ها تحت فرایند استخراج در سه دمای ۶۵، ۸۰ و ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سه زمان ۹۰، ۶۰ و ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. عصاره حاصل پس از خنک شدن تا دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد)، به مدت ۳۰ دقیقه در سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا ناخالصی‌های جامد جدا شوند. محلول رویی سپس با اتانول مطلق و در نسبت ۱:۱ مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا پکتین به صورت ژل در محیط اتانول رسوب کند. مخلوط دوباره به مدت ۳۰ دقیقه و در سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. توده پکتین رسوب‌کرده برای حذف منوساکاریدها و دی‌ساکاریدها، سه بار با اتانول ۹۶ درصد و با استفاده از کاغذ صافی و قیف بوخنر شست‌وشو داده شد. پکتین تر حاصل در آون و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک و بعد با آسیاب آزمایشگاهی پودر شد.

در سه سطح (+۱، ۰، -۱) و با سه تکرار در نقطه مرکزی برای برآورد خطای آزمایش و سنجش تکرارپذیری مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). طرح باکس-بنکن شامل ۱۵ آزمایش بود که دربرگیرنده ۱۲ آزمایش فاکتوریل و ۳ آزمایش تکراری در نقطه مرکزی بود. تمام آزمایش‌ها به صورت کاملاً تصادفی انجام شدند تا اثر عوامل کنترل نشده و خطاهای سیستماتیک بر نتایج کاهش یابد. متغیرهای مستقل براساس رابطه ۱ کدگذاری شدند.

رابطه (۱)

$$X = \frac{Xi - X0}{\Delta X}$$

که در آن X مقدار کدگذاری شده،  $X_i$  مقدار واقعی متغیر،  $X_0$  مقدار واقعی در نقطه مرکزی دامنه و  $\Delta X$  بیانگر تغییر مقدار  $X_i$  متناظر با یک واحد تغییر در مقدار کدگذاری شده X است. رابطه ۲ مدل ریاضی مورد استفاده در طرح باکس-بنکن را نشان می‌دهد.

رابطه (۲)

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

در این رابطه، K بیانگر تعداد متغیرهای مستقل است و  $X_i$  و  $X_j$  نیز هر یک نشان‌دهنده متغیرهای مستقل مدل می‌باشند.  $\beta_0$  ضریب ثابت، ضرایب  $\beta_j$  و  $\beta_{jj}$  و  $\beta_{ij}$  به ترتیب نشان‌دهنده اثرهای خطی، اثرهای درجه دوم (مربعی) و اثرهای متقابل میان متغیرها هستند. ضرایب رگرسیون مربوط به مدل‌های خطی، درجه دوم و اثرهای متقابل با استفاده از رگرسیون خطی چندگانه تعیین شدند. برای تحلیل رگرسیونی داده‌های تجربی، از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۱۳ استفاده شد. آزمون t برای بررسی معنی‌داری آماری ضرایب رگرسیون و

جدول ۱- سطوح تنظیم شده‌ی متغیرهای فرایند در استخراج پکتین به روش اسیدی.

Table 1- Process variables and their adjusted levels for acid extraction of pectin

| Factor                                       | Actual Levels |    |    |
|--|---------------|----|----|
|  | -1            | 0  | +1 |
| Extraction Temperature (°C, X <sub>1</sub> ) | 65            | 80 | 95 |
| Time (min, X <sub>2</sub> )                  | 30            | 60 | 90 |
| pH (X <sub>3</sub> )                         | 1             | 2  | 3  |

جدول ۲- طراحی سطح پاسخ Box-Behnken برای استخراج به روش اسیدی.

Table 2- Box-Behnken response surface design for acid extraction of pectin

| No. | Temperature (°C, X <sub>3</sub> ) | Extraction time (min, X <sub>1</sub> ) | pH (X <sub>2</sub> ) |
|-----|-----------------------------------|--|----------------------|
| 1   | 80                                | 60                                     | 2                    |
| 2   | 80                                | 90                                     | 3                    |
| 3   | 80                                | 30                                     | 1                    |
| 4   | 80                                | 60                                     | 2                    |
| 5   | 65                                | 60                                     | 1                    |
| 6   | 95                                | 60                                     | 3                    |
| 7   | 80                                | 30                                     | 3                    |
| 8   | 95                                | 60                                     | 1                    |
| 9   | 95                                | 90                                     | 2                    |
| 10  | 80                                | 90                                     | 1                    |
| 11  | 65                                | 60                                     | 3                    |
| 12  | 65                                | 30                                     | 2                    |
| 13  | 95                                | 30                                     | 2                    |
| 14  | 80                                | 60                                     | 2                    |
| 15  | 65                                | 90                                     | 2                    |

تعیین بازده

بازده پکتین استخراج شده بر اساس رابطه‌ی ۳ محاسبه شد (Pei et al., 2024):

رابطه (۳)

$$\text{بازده} = \frac{\text{وزن خشک پکتین}}{\text{وزن پودر خشک آلبیدو}} \times 100$$

آنالیز شیمیایی پکتین

تعیین محتوای گالاکتورونیک اسید (GalA)

محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین با استفاده از روش

رنگ‌سنجی مبتنی بر معرف متاهیدروکسی‌دی‌فنیل و مطابق با روش گزارش شده توسط [Mosayebi & Emam Djomeh \(2017\)](#) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۱ میلی‌لیتر از محلول پکتین با غلظت ۰/۰۲ درصد (وزنی/حجمی) با ۶ میلی‌لیتر از محلول ۱۲/۵ میلی‌مولار سدیم تترابورات در سولفوریک اسید غلیظ (۹۵-۹۸ درصد) داخل یک لوله آزمایش مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۶ دقیقه در حمام آب جوش (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) حرارت‌دهی و بعد در حمام آب یخ سرد شد. در ادامه، ۰/۱ میلی‌لیتر (۱۰۰ میکرولیتر) از معرف متاهیدروکسی‌دی‌فنیل ۰/۱۵ درصد (وزنی/حجمی) در ۰/۱۲۵ مولار سدیم هیدروکسید به لوله اضافه شد. جذب محلول پس از ۱۵ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتوی فرابنفش-مرئی مدل T۹۲+ شرکت

## نتایج

### گزینش مدل مناسب

داده‌های تجربی به دست آمده برای بازده، محتوای گالاتکترونیک اسید (GalA) و درجه استری شدن (DE) پکتین به مدل‌های مختلف شامل مدل خطی، مدل اثرهای متقابل (2FI)، مدل درجه دوم و مدل درجه سوم برازش داده شدند. سپس این مدل‌ها با استفاده از رگرسیون آماری و آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی گردیدند تا مناسب‌ترین مدل تجربی انتخاب شود. براساس نتایج نرم افزار Design Expert، مدل چندجمله‌ای درجه‌ی دوم به عنوان مدل مناسب برای توصیف تغییرات بازده، GalA و DE معرفی شد. معنی داری آماری مدل‌های انتخاب شده و ضرایب رگرسیونی آن‌ها به وسیله تحلیل ANOVA بررسی شد؛ به طوری که افزایش مقدار F و کاهش مقدار P بیانگر معنی داری بیشتر مدل است. برای بهینه سازی دقیق تر شرایط استخراج و تحلیل اثرهای سه عامل فرایندی بر بازده، DE و GalA، از طرح باکس بنکن (جدول ۳) استفاده شد که امکان تعیین شرایط بهینه استخراج اسیدی پوست لیموترش را فراهم می‌کند.

### شرایط بهینه استخراج پکتین

#### اثر عوامل متغیر استخراج بر بازده

در این پژوهش، ۱۵ تیمار آزمایشی مطابق با شرایط تعیین شده در طرح باکس بنکن برای استخراج پکتین مورد استفاده قرار گرفت. اثر متغیرهای استخراج در مرحله‌ی نخست با تحلیل رگرسیون بررسی شد (جدول ۴). فاکتورهای آزمایشی در جدول ۲ و ضرایب رگرسیونی ارائه شده در جدول ۴ در رابطه رگرسیونی ۵ جای گذاری شدند تا بازده استخراج پکتین از پوست لیموترش پیش بینی و مدل سازی شود.

$$Y(\%) = +84.02065 - 0.584954X_A - 0.000652X_B - 19.49000X_C + 0.000333X_A X_B + 0.044833X_A X_C -$$

$$0.003417X_B X_C + 0.004048X_A^2 + 0.001006X_B^2 - 0.666667X_C^2$$

رابطه (۵)

دمای °C ۸۰، زمان ۹۰ دقیقه و pH برابر با ۱ حاصل شد. این

PG ساخت کشور انگلیس در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

### تعیین درجه استری شدن (DE)

درجه استری شدن پکتین استخراج شده با استفاده از روش تیتراسنجی [Hosseini](#) و همکاران (۲۰۱۶) اندازه گیری شد. در ابتدا، ۲ میلی لیتر اتانول به ۱۰۰ میلی گرم پکتین خشک افزوده شد و مخلوط در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر بدون کربن دی اکسید در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد حل گردید. پس از انحلال کامل، پنج قطره معرف فنل فتالین افزوده شد و نمونه با محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ تیترا گردید. حجم سود مصرفی در این مرحله به عنوان تیترا خنثی سازی (V<sub>1</sub>) ثبت شد. در مرحله بعد، به محلول پکتین خنثی شده، ۱۰ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار افزوده شد و نمونه به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط گردید تا گروه‌های استری شده پکتین صابونی شوند. سپس ۱۰ میلی لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۵ مولار اضافه شد و محلول تا بی رنگ شدن کامل تکان داده شد. در ادامه، پنج قطره فنل فتالین افزوده شد و محلول با سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار تا ایجاد رنگ صورتی کم رنگ پایدار تیترا گردید. حجم سود مصرف شده در این مرحله به عنوان تیترا صابونی شدن (V<sub>2</sub>) یادداشت شد. درجه استری شدن (DE) پکتین بر اساس رابطه ۴ محاسبه شد.

رابطه (۴)

$$DE(\%) = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \times 100$$

بیشترین بازده استخراج پکتین، ۵۳/۸ درصد، در شرایط

لیموترش، در شرایط بهینه استخراج اسیدی، قابلیت تولید پکتین با بازده چشمگیرتر نسبت به بسیاری از منابع گیاهی دیگر و گزارش‌های پیشین دارد.

جدول ۳ شرایط هر تیمار استخراجی و مقادیر اندازه‌گیری شده هریک از پاسخ‌ها شامل بازده استخراج، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید را تحت شرایط مختلف فرایند استخراج نشان می‌دهد.

مقدار بازده به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از نتایج گزارش شده توسط [Hosseini](#) و همکاران (۲۰۱۶) است؛ آنان در شرایط استخراج با سیتریک اسید شامل زمان ۹۰ دقیقه، pH برابر ۱/۵ و دمای °C ۹۵، بازده برابر ۲۸/۷۸ درصد به دست آوردند. همچنین در مطالعه [Gonfa](#) و [Mamiru](#) (۲۰۲۳) حداکثر بازده استخراج پکتین از پوست هندوانه در شرایط دمای °C ۹۰، زمان ۱۰۰ دقیقه و pH برابر ۲ برابر ۱۸/۹۸ درصد گزارش شد. این نتایج نشان می‌دهد که پوست

جدول ۳- متغیرهای مستقل، مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر تجربی پکتین استخراج شده به روش اسیدی از پوست لیموترش

بر اساس روش سطح پاسخ

**Table 3- Independent variables, predicted values, and experimental values of acid-extracted pectin from lime peel based on the response surface methodology**

| No. | Indep.     |           |    | Exp.  |       |         | Pred. |       |          |
|-----|------------|-----------|----|-------|-------|---------|-------|-------|----------|
|     | Temp. (°C) | Time(min) | pH | Y(%)  | DE(%) | GaLA(%) | Y(%)  | DE(%) | GaLA (%) |
| 1   | 80         | 60        | 2  | 30    | 20.38 | 63.5    | 30.23 | 20.62 | 63.37    |
| 2   | 80         | 90        | 3  | 16.44 | 41.17 | 71.58   | 14.19 | 42.99 | 71.75    |
| 3   | 80         | 30        | 1  | 44.3  | 10.12 | 40.08   | 46.55 | 8.29  | 39.92    |
| 4   | 80         | 60        | 2  | 30.2  | 21.42 | 62.8    | 30.23 | 20.62 | 63.37    |
| 5   | 65         | 60        | 1  | 47.5  | 10.1  | 38.58   | 47.94 | 10.28 | 37.41    |
| 6   | 95         | 60        | 3  | 14.8  | 54.5  | 73.34   | 14.36 | 54.31 | 74.51    |
| 7   | 80         | 30        | 3  | 7.35  | 61.11 | 87.83   | 9.20  | 59.30 | 84.61    |
| 8   | 95         | 60        | 1  | 51.4  | 20.28 | 36.75   | 50.57 | 20.11 | 34.86    |
| 9   | 95         | 90        | 2  | 33.8  | 20    | 61.38   | 36.48 | 18.35 | 60.05    |
| 10  | 80         | 90        | 1  | 53.8  | 9.13  | 33.75   | 51.95 | 10.93 | 36.98    |
| 11  | 65         | 60        | 3  | 8.21  | 59    | 75.34   | 9.04  | 59.16 | 77.23    |
| 12  | 65         | 30        | 2  | 30    | 21.07 | 69.25   | 27.31 | 22.71 | 70.58    |
| 13  | 95         | 30        | 2  | 33    | 20.72 | 64.58   | 31.59 | 22.71 | 66.63    |
| 14  | 80         | 60        | 2  | 30.5  | 20.07 | 63.8    | 30.23 | 20.62 | 63.37    |
| 15  | 65         | 90        | 2  | 31.4  | 15.38 | 63.41   | 32.81 | 13.38 | 61.36    |

Indep: independent variables, Exp: experiment value, Pred: predict value.

ارائه شده‌اند. براساس این نتایج، مدل رگرسیونی مربوط به پاسخ‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنادار بوده و از برازش مناسبی برای تبیین اثر متغیرهای مستقل بر بازده برخوردار است.

بیشترین و کمترین بازده استخراج پکتین به ترتیب به آزمایش شماره ۱۰ با بازده ۵۳/۸ درصد و آزمایش شماره ۱۱ با بازده ۸/۲۱ درصد اختصاص داشت. نتایج آنالیزهای آماری مربوط به استخراج پکتین در جدول‌های ۴، ۵، ۶ و ۷

جدول ۴- آزمون مدل رگرسیونی مربوط به بازده، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین

**Table 4 - Regression model evaluation for pectin yield, degree of esterification, and galacturonic acid content. Sequential Model Sum of Squares**

| Response 1: Yield  |                |    |             |         |         |           |
|--------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|-----------|
| Source             | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value |           |
| Mean vs Total      | 14272.75       | 1  | 14272.75    |         |         |           |
| Linear vs Mean     | 2905.59        | 3  | 968.53      | 225.61  | <0.0001 | Suggested |
| 2FI vs Linear      | 1.94           | 3  | 0.6470      | 0.1143  | 0.9492  |           |
| Quadratic vs 2FI   | 8.03           | 3  | 2.68        | 0.3590  | 0.7858  |           |
| Cubic vs Quadratic | 37.13          | 3  | 12.38       | 195.42  | 0.0051  | Aliased   |
| Residual           | 0.1267         | 2  | 0.0633      |         |         |           |
| Response 2: DE     |                |    |             |         |         |           |
| Source             | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value |           |
| Mean vs Total      | 10905.32       | 1  | 10905.32    |         |         |           |
| Linear vs Mean     | 3556.54        | 3  | 1158.51     | 14.42   | 0.0004  |           |
| 2FI vs Linear      | 149.83         | 3  | 49.94       | 0.5293  | 0.6746  |           |
| Quadratic vs 2FI   | 727.20         | 3  | 242.40      | 43.91   | 0.0005  | Suggested |
| Cubic vs Quadratic | 26.60          | 3  | 8.87        | 17.73   | 0.0538  | Aliased   |
| Residual           | 1.00           | 2  | 0.5000      |         |         |           |
| Response 3: GaLA   |                |    |             |         |         |           |
| Source             | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value |           |
| Mean vs Total      | 54718.78       | 1  | 54718.78    |         |         |           |
| Linear vs Mean     | 3296.18        | 3  | 1098.73     | 45.92   | <0.0001 | Suggested |
| 2FI vs Linear      | 26.35          | 3  | 8.78        | 0.2967  | 0.8269  |           |
| Quadratic vs 2FI   | 193.65         | 3  | 64.55       | 7.48    | 0.0269  | Suggested |
| Cubic vs Quadratic | 42.64          | 3  | 14.21       | 53.98   | 0.0182  | Aliased   |
| Residual           | 0.5267         | 2  | 0.2633      |         |         |           |

بر این، مقدار بالای ضریب تبیین تعدیل شده (۹۶/۴۷) نشان دهنده برازش مناسب مدل است. در استخراج پکتین به روش اسیدی، تحلیل RSM نشان داد که اثر خطی زمان (p-Value=۰/۰۴۳۲) و اثر خطی pH (p-Value<۰/۰۰۰۱) تأثیر معنی داری بر بازده استخراج دارند. نتایج به دست آمده با مشاهدات حاصل از نمودارهای سطح پاسخ نیز سازگار بود.

جدول ۵ نتایج آنالیز واریانس بازده پکتین استخراجی (ANOVA) را نشان می دهد. معادله خطی به دست آمده از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار بود (P=۰/۰۰۰۳) و آزمون عدم برازش نیز مقدار معنی داری نشان داد (P=۰/۰۰۵۱). ضریب تبیین (R<sup>2</sup>) محاسبه شده برای بازده استخراج برابر با ۹۸/۷۴ بود که بیان می کند تنها ۱/۲۶ درصد از تغییرات مشاهده شده توسط مدل قابل توضیح نیست. علاوه

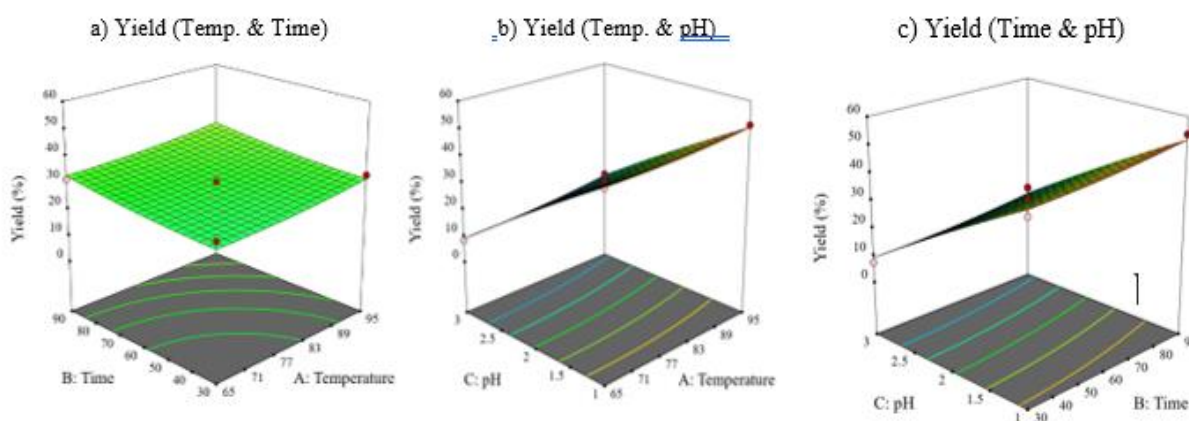
جدول ۵- تحلیل تغییرات و تأثیر سه فاکتور در طرح باکس-بنکن بر بازده استخراج

Table 5- Analysis of variance and the effects of three factors in the Box-Behnken design on pectin extraction yield.

| Source         | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value  | p-value |             |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|---------|-------------|
| Model          | 2915.56        | 9  | 323.95      | 43.48*   | 0.0003  | significant |
| A-Temp.        | 31.56          | 1  | 31.56       | 4.24     | 0.0947  |             |
| B-Time         | 54.02          | 1  | 54.03       | 7.25*    | 0.0432  |             |
| C-pH           | 2820.00        | 1  | 2820.00     | 378.46** | <0.0001 |             |
| AB             | 0.0900         | 1  | 0.0900      | 0.0121   | 0.9168  |             |
| AC             | 1.81           | 1  | 1.81        | 0.2428   | 0.6431  |             |
| BC             | 0.0420         | 1  | 0.0420      | 0.0056   | 0.9430  |             |
| A <sup>2</sup> | 3.06           | 1  | 3.06        | 0.4111   | 0.5496  |             |
| B <sup>2</sup> | 3.03           | 1  | 3.03        | 0.4066   | 0.5518  |             |
| C <sup>2</sup> | 1.64           | 1  | 1.64        | 0.2202   | 0.6586  |             |
| Residual       | 37.26          | 5  | 7.45        |          |         |             |
| Lack of Fit    | 37.13          | 3  | 12.38       | 195.42   | 0.0051  |             |
| Pure Error     | 0.1267         | 2  | 0.0633      |          |         |             |
| Cor Total      | 2952.82        | 14 |             |          |         |             |
| R2             | 0.9874         |    |             |          |         |             |
| Adjusted R2    | 0.9647         |    |             |          |         |             |

\* Significant at 5 % level (p < 0.05). \*\*Significant at 1 % level (p < 0.01).

کاهش pH (شکل‌های b-۱ و c-۱) و افزایش زمان (شکل‌های a-۱ و c-۱) موجب افزایش بازده استخراج (شکل‌های a-۱ و b-۱) در نمودارهای سطح پاسخ شدند.



شکل ۱- سطح پاسخ بازده

Fig. 1. Response surface diagram of Yield

از تغییرات مشاهده شده توسط مدل قابل توصیف نیست. افزون بر این، ضریب تبیین تعدیل شده نیز بیانگر برازش مناسب مدل و کیفیت مطلوب پیش بینی آن است. درجه استری شدن پکتین بر اساس عوامل آزمایشی (جدول ۱) و ضرایب رگرسیونی (جدول ۴) پیش بینی شد و نتایج نشان داد که متغیرهای فرایندی نقش مهمی در تغییرات DE دارند.

اثر عوامل متغیر استخراج بر درجه استری شدن جدول ۳، نتایج آزمایش های مربوط به درجه استری شدن پکتین را نشان می دهد. تحلیل واریانس این متغیر نشان داد که مدل رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی دار است، درحالی که آزمون عدم برازش معنی دار نبود؛ بنابراین، مدل از برازش قابل قبول و رفتار پیش بینی پذیر برخوردار است. بر اساس مقدار ضریب تبیین ( $R^2=99/38$ )، تنها ۰/۶۲ درصد

$$DE (\%) = +34.02009 - 1.10690X_A + 0.442250X_B - 3.05625X_C + 0.002761X_AX_B - 0.244667X_AX_C - 0.157917X_BX_C + 0.009459X_A^2 - 0.003844X_B^2 + 13.218333X_C^2 \quad \text{رابطه (۶)}$$

از نظر بازده (دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، زمان ۹۰ دقیقه و pH برابر با ۱)، مقدار پیش بینی شده درجه استری شدن برابر ۵۹/۳۰ درصد بود. این مقدار با نتایج حاصل از سه تکرار آزمایشی در همان شرایط سازگاری داشت و تفاوت ناچیزی با مقدار تجربی نشان داد که اعتبار مدل پیش بینی کننده را تأیید می کند.

بیشترین درجه استری شدن پکتین، برابر ۶۱/۱۱ درصد، در شرایط زمان ۳۰ دقیقه، pH برابر با ۳ و دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حاصل شد که نشان دهنده تولید پکتین با درجه متوکسیل بالا است. کمترین مقدار درجه استری شدن، ۹/۱۳ درصد، در شرایط زمان ۹۰ دقیقه، pH برابر با ۱ و دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به دست آمد که در محدوده ی پکتین کم متوکسیل قرار می گیرد (جدول ۳). در نقطه بهینه استخراج

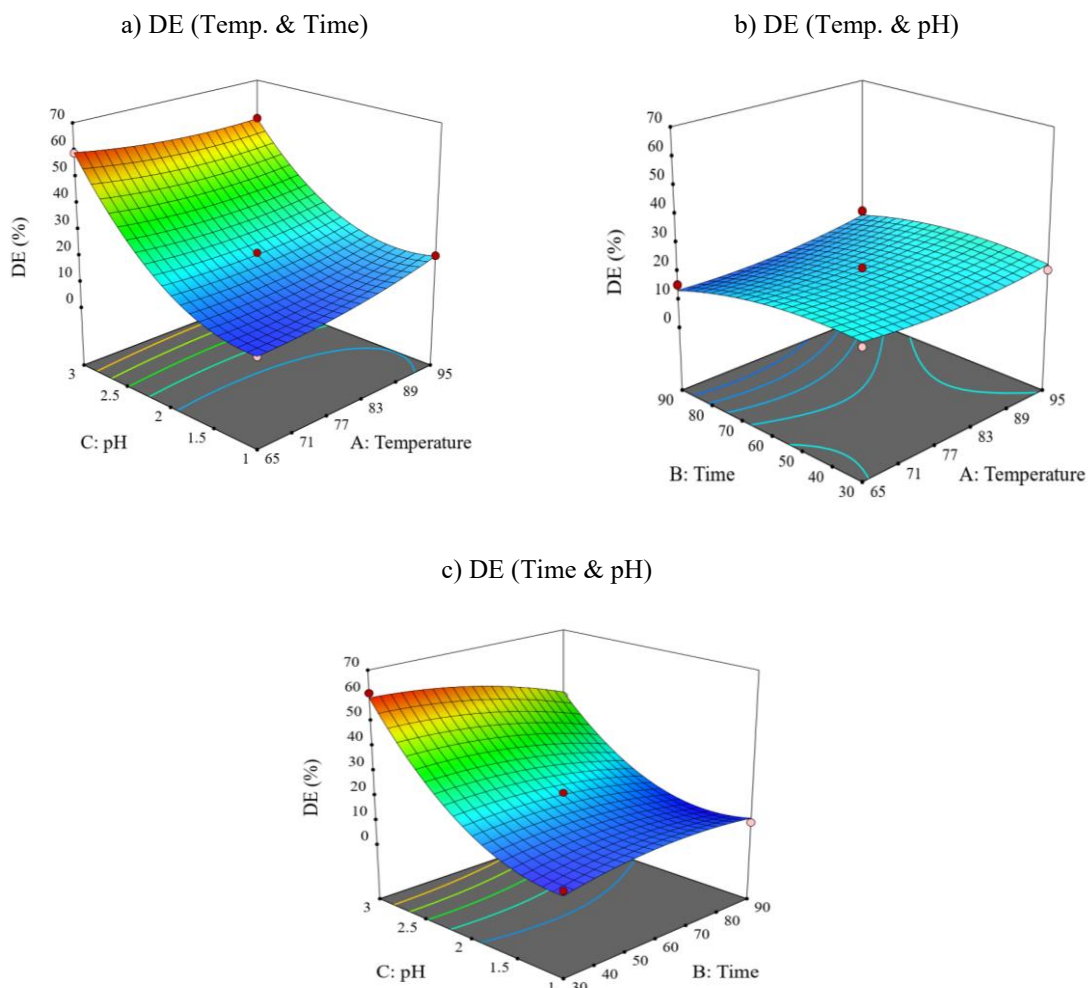
جدول ۶- تحلیل تغییرات و تأثیر سه فاکتور در طرح باکس-بنکن بر درجه استری شدن پکتین

Table 6- Analysis of variance and the effects of three factors in the Box-Behnken design on the degree of esterification of pectin

| Source                  | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value   |                 |
|-------------------------|----------------|----|-------------|---------|-----------|-----------------|
| Model                   | 4433.56        | 9  | 492.62      | 89.23   | <0.0001** | significant     |
| A-Temp.                 | 12.38          | 1  | 12.38       | 2.24    | 0.1946    |                 |
| B-Time                  | 93.43          | 1  | 93.43       | 16.92   | 0.0092**  |                 |
| C-pH                    | 3450.73        | 1  | 3450.73     | 625.06  | <0.0001** |                 |
| AB                      | 6.18           | 1  | 6.18        | 1.12    | 0.3386    |                 |
| AC                      | 53.88          | 1  | 53.88       | 9.76    | 0.0261*   |                 |
| BC                      | 89.78          | 1  | 89.78       | 16.26   | 0.0100*   |                 |
| A <sup>2</sup>          | 16.73          | 1  | 16.73       | 3.03    | 0.1422    |                 |
| B <sup>2</sup>          | 44.18          | 1  | 44.18       | 8.00    | 0.0367*   |                 |
| C <sup>2</sup>          | 645.14         | 1  | 645.14      | 116.86  | 0.0001**  |                 |
| Residual                | 27.60          | 5  | 5.52        |         |           |                 |
| Lack of Fit             | 26.60          | 3  | 8.87        | 17.73   | 0.0538    | not significant |
| Pure Error              | 1.00           | 2  | 0.5000      |         |           |                 |
| Cor Total               | 4461.16        | 14 |             |         |           |                 |
| R <sup>2</sup>          | 0.9938         |    |             |         |           |                 |
| Adjusted R <sup>2</sup> | 0.9827         |    |             |         |           |                 |

بیشترین مقدار استخراج را به خود اختصاص داد؛ در مقابل، در pH بالاتر از ۲، پکتین با درجه متوکسیل بالا بیشترین بازده را نشان داد (جدول ۳). اثر متقابل دما و pH (AC) و نیز زمان و pH (BC) تأثیر معنی‌داری بر درجه استری شدن پکتین داشتند ( $p < 0.01$ ). علاوه بر این، نمودارهای سطح پاسخ نشان دادند که با کاهش pH، درجه استری شدن پکتین نیز کاهش می‌یابد (شکل‌های ۲b و ۲c).

اثر عوامل متغیر بر درجه استری شدن پکتین استخراج شده از پوست لیموترش با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح باکس-بنکن مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۶). نتایج نشان داد که در استخراج اسیدی پکتین، عبارت مرتبه اول  $p < 0.0001$ ، عبارت مرتبه اول زمان ( $p < 0.0092$ ) و نیز عبارت مرتبه دوم pH ( $p < 0.0001$ ) اثر معنی‌دار و قابل توجهی بر درجه استری شدن پکتین داشتند. زمانی که اسیدیته کمتر از ۲ بود، پکتین کم‌متوکسیل



شکل ۲- سطح پاسخ درجه استری شدن

Fig. 2. Response surface diagram of the degree of esterification

ضریب تبیین ( $R^2=98/79$ )، شان دهنده برآزش بسیار مناسب مدل بودند. محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین استخراج شده از پوست لیموترش (جدول ۳) با استفاده از عوامل متغیر فرایندی و ضرایب رگرسیون ارائه شده در جدول های ۱ و ۷ در معادله مدل وارد و مقدار آن پیش بینی شد.

اثر متغیرهای استخراج بر محتوای گالاکتورونیک اسید در این مطالعه، برای تعیین گالاکتورونیک اسید از معرف دی فنیل استفاده شد که حساسیت اندکی نسبت به قندهای خنثی دارد. داده های حاصل براساس منحنی استاندارد گالاکتورونیک اسید، کمی سازی شدند (Pei et al., 2024). نتایج تحلیل رگرسیونی (جدول ۷) مربوط به محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین، شامل ضرایب رگرسیونی و

$$\text{GalA (\%)} = +0.504352 + 0.192287X_A - 0.323472X_B + 52.47125X_C + 0.001467X_A X_B - 0.002833X_A X_C - 0.082667X_B X_C - 0.002265X_A^2 + 0.001998X_B^2 - 6.85458X_C^2 \quad \text{رابطه (۷)}$$

در مدل ظاهر شده باشد، بیشترین اثر را بر محتوای گالاکتورونیک اسید نشان داد ( $P < 0/05$ ).

میزان pH

صرف نظر از این که در قالب عبارت مرتبه اول یا مرتبه دوم

جدول ۷- تحلیل تغییرات و تأثیر سه فاکتور در طرح باکس-بنکن بر محتوای گالاکتورونیک اسید

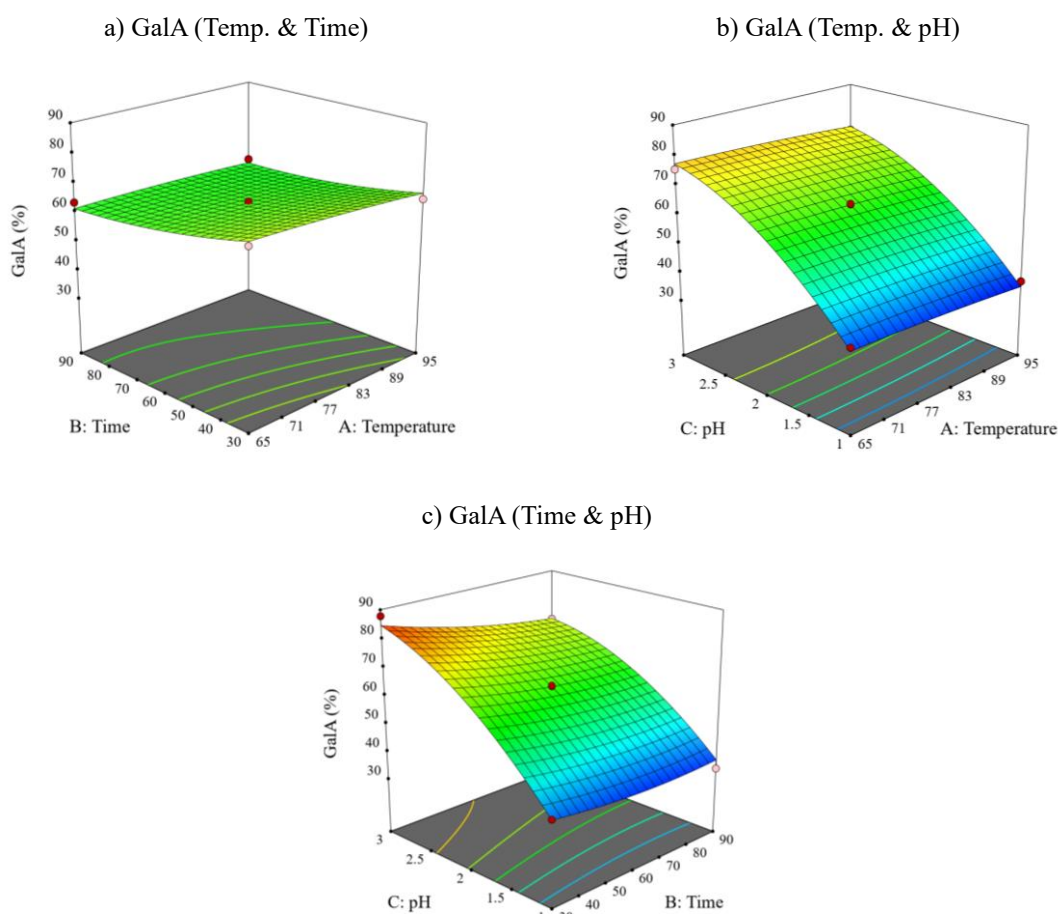
Table 7- Analysis of variance and the effects of three factors in the Box-Behnken design on galacturonic acid content

| Source                  | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value |             |
|-------------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|-------------|
| Model                   | 3516.18        | 9  | 390.69      | 45.25   | 0.0003  | significant |
| A-Temp.                 | 13.86          | 1  | 13.86       | 1.61    | 0.2610  |             |
| B-Time                  | 124.98         | 1  | 124.98      | 14.48   | 0.0126  |             |
| C-pH                    | 3157.34        | 1  | 3157.34     | 365.69  | <0.0001 |             |
| AB                      | 1.74           | 1  | 1.74        | 0.2018  | 0.6721  |             |
| AC                      | 0.0072         | 1  | 0.0072      | 0.0008  | 0.9780  |             |
| BC                      | 24.60          | 1  | 24.60       | 2.85    | 0.1522  |             |
| A <sup>2</sup>          | 0.9588         | 1  | 0.9588      | 0.1111  | 0.7525  |             |
| B <sup>2</sup>          | 11.94          | 1  | 11.94       | 1.38    | 0.2926  |             |
| C <sup>2</sup>          | 173.48         | 1  | 173.48      | 20.09   | 0.0065  |             |
| Residual                | 43.17          | 5  | 8.63        |         |         |             |
| Lack of Fit             | 42.64          | 3  | 14.21       | 53.95   | 0.0182  |             |
| Pure Error              | 0.5267         | 2  | 0.2633      |         |         |             |
| Cor Total               | 3559.35        | 14 |             |         |         |             |
| R <sup>2</sup>          | 0.9879         |    |             |         |         |             |
| Adjusted R <sup>2</sup> | 0.9660         |    |             |         |         |             |

مرتبه اول زمان بودند که همگی رابطه مثبت با محتوای گالاکتورونیک اسید داشتند (جدول ۷). همچنین با توجه به نمودارهای سطح پاسخ، اگرچه کاهش pH موجب افت محتوای گالاکتورونیک اسید می شود، اما هنگامی که مقدار pH بیش از ۲/۶ باشد، روند تغییرات معکوس شده و افزایشی

نتایج نمودارهای سطح پاسخ نشان داد که با کاهش pH، محتوای گالاکتورونیک اسید در پکتین به طور معنی داری کاهش می یابد (شکل های ۳b و ۳c). براساس تحلیل ها، مهم ترین عوامل مؤثر بر استخراج پکتین به روش اسیدی شامل عبارت مرتبه اول pH، عبارت مرتبه دوم pH و عبارت

می‌گردد (شکل‌های ۳b و ۳c).



شکل ۳- سطح پاسخ محتوای گالاکتورونیک اسید

**Fig. 3. Response surface diagram of the galacturonic acid content**

توسط مدل RSM با داده‌های تجربی حاصل از آزمایش‌ها تطابق کامل داشته و این موضوع اعتبار و کارایی مدل بهینه‌سازی را تأیید می‌کند.

شرایط بهینه درجه استری شدن پکتین در دمای ۶۶/۸۷ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۶/۱۹ دقیقه و pH برابر با ۲/۹۶ به دست آمد. در این شرایط، بیشترین مقدار درجه استری شدن در محدوده سطح پاسخ مشاهده گردید. مقدار بهینه پیش‌بینی شده برای درجه استری شدن مورد ارزیابی تجربی قرار گرفت و نتایج به دست آمده با مقادیر پیش‌بینی شده تطابق

### شرایط بهینه استخراج

بهینه‌سازی شرایط استخراج پکتین از پوست لیموترش با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد. جدول ۸، مقادیر مربوط به بازده، محتوای گالاکتورونیک اسید و درجه استری شدن پکتین استخراج شده را نشان می‌دهد. براساس تحلیل بازده، شرایط بهینه استخراج پکتین در دمای ۹۴/۹۹ درجه سانتی‌گراد، زمان ۸۸/۶۶ دقیقه و pH برابر با ۱ به دست آمد. در این شرایط، بیشینه بازده در محدوده سطح پاسخ مشاهده شد. نتایج نشان داد که مقدار بهینه پیش‌بینی شده

بهبود به دست آمد. نتایج تجربی اندازه گیری شده برای محتوای گالاکتورونیک اسید، مقادیر پیش بینی شده توسط مدل را تأیید کرد که بیانگر دقت و قابلیت اعتماد مدل بهینه سازی است.

کامل داشت که این موضوع اعتبار مدل پیش بینی کننده را تأیید می کند.

محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین در شرایط دمایی ۷۴/۰۱ درجه سانتی گراد، زمان ۳۰ دقیقه و pH برابر با ۳

جدول ۸- شرایط بهینه استخراج برای بازده، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک اسید بر اساس روش سطح پاسخ

**Table 8- Optimized extraction conditions for pectin yield, degree of esterification, and galacturonic acid content based on the response surface methodology**

| Factor     | Low | High | Optimum conditions | Predicted values solution | Observed values |
|------------|-----|------|--------------------|---------------------------|-----------------|
| Yield (%)  |     |      |                    | 53.81                     | 51.23           |
| Temp. (°C) | 65  | 95   | 94.99              |                           |                 |
| Time (min) | 30  | 90   | 88.66              |                           |                 |
| pH         | 1   | 3    | 1                  |                           |                 |
| DE (%)     |     |      |                    | 61.63                     | 60.07           |
| Temp. (°C) | 65  | 95   | 66.87              |                           |                 |
| Time (min) | 30  | 90   | 36.19              |                           |                 |
| pH         | 1   | 3    | 2.96               |                           |                 |
| GalA (%)   |     |      |                    | 85.33                     | 83.5            |
| Temp. (°C) | 65  | 95   | 74.01              |                           |                 |
| Time (min) | 30  | 90   | 30                 |                           |                 |
| pH         | 1   | 3    | 3                  |                           |                 |

## بحث

فیزیکی و شیمیایی آن را تحت تأثیر قرار می دهد. در مقابل، هنگام استفاده از اسید به عنوان حلال استخراج، به ویژه اسیدهای معدنی مانند سولفوریک اسید، کلریدریک اسید و نیتریک اسید، احتمال تبخیر یا تولید آلاینده های خطرناک وجود دارد که ممکن است باعث بروز مشکلات تنفسی یا ناراحتی های جسمی در انسان شود ([Marwa Mahmoud et al., 2022](#)). افزون بر این، تخلیه فاضلاب اسیدی می تواند با تغییر pH آب های صنعتی و خانگی، اثر بافری طبیعی منابع آبی را مختل کند، رشد میکروارگانیسم ها را کاهش دهد و فرایند تصفیه طبیعی آب ها را با مشکل مواجه سازد. همچنین افزایش نمک های معدنی در پساب اسیدی موجب افزایش

فرایند تولید پکتین شامل چهار مرحله اصلی استخراج، رسوب دهی الکلی، تصفیه و خشک کردن است. با این حال، شرایط استخراج به ویژه دما، pH و زمان، بیشترین تأثیر را بر خواص نهایی پکتین دارند. از نظر نوع حلال مورد استفاده، زمانی که باز به عنوان عامل استخراج به کار می رود، پدیده هیدرولیز قلیایی رخ می دهد که موجب کاهش طول زنجیره گالاکتورونیک اسید و کاهش تعداد گروه های متیل و استیل می شود ([Pei et al., 2024](#)). به عبارت دیگر، هر چند استفاده از محیط قلیایی می تواند بازده استخراج را افزایش دهد، اما موجب تغییر ساختار مولکولی پکتین شده و ویژگی های

با محلول‌های اسیدسیتریک در pHهای مختلف استخراج کرده و به نقش مؤثر pH پایین در افزایش بازده استخراج اشاره کردند. بررسی‌ها نشان داد که pH مهم‌ترین فاکتور اثرگذار بر بازده استخراج پکتین است. همان‌گونه که در شکل‌های ۱b و ۱c مشاهده می‌شود، کاهش pH سبب افزایش قابل توجه بازده استخراج شده است؛ به طوری که بیشترین بازده در کمترین pH به دست آمد و با افزایش pH، بازده کاهش یافت. این الگو با گزارش‌های متعددی از پژوهشگران همخوانی دارد (Chen, [Yapo et al., 2007](#); [et al., 2015](#)). افزایش بازده پکتین در pH پایین را می‌توان به افزایش قدرت اسیدیته، تخریب مؤثرتر دیواره سلولی و آزادسازی بیشتر پکتین نسبت داد. بنابراین، هرچه pH استخراج پایین‌تر باشد، تخریب دیواره سلولی شدیدتر و آزادسازی و استخراج پکتین بیشتر خواهد بود ([Ma et al., 2013](#)).

شکل ۱c که تأثیر pH و زمان استخراج (۳۰ تا ۹۰ دقیقه) را در دمای ثابت نشان می‌دهد، مشابه شکل ۱b، وجود یک سطح شیب‌دار با غلبه واضح اثر pH را به خوبی نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، بازده با کاهش pH به طور چشمگیری افزایش می‌یابد که این موضوع بار دیگر نقش تعیین‌کننده محیط اسیدی را در فرایند استخراج تأیید می‌کند. با این حال، شیب ملایم‌تر در امتداد محور زمان نشان می‌دهد که اگرچه افزایش مدت زمان استخراج تأثیر مثبت بر بازده دارد، اما این اثر محدود و کمتر قابل توجه است. این نتیجه‌گیری بصری با معنی‌داری متوسط عامل زمان در ANOVA ( $P=0/0126$ ) و ضریب کوچک و منفی آن ( $-0/00652$ ) در معادله رگرسیونی کاملاً هم‌خوانی دارد.

مقایسه شکل ۱c با شکل ۱b که اثر pH-دما را نشان می‌دهد، بیانگر آن است که عامل زمان نسبت به دما اثر اندکی بیشتر اما همچنان ناچیز در مقایسه با pH بر بازده دارد. این تفاوت را می‌توان با سازکار انتشار جرم تفسیر کرد. قرار گرفتن طولانی مدت ماده خام در برابر حلال اسیدی موجب افزایش نفوذ حلال به درون ماتریس جامد و در پی آن افزایش هیدرولیز می‌شود؛ عاملی که خروج پکتین از بافت

سختی آب شده و پیامدهای منفی برای رشد جانداران و اکوسیستم‌های آبی به همراه دارد. با توجه به ملاحظات زیست‌محیطی و نقش شرایط استخراج بر خواص نهایی پکتین، مطالعات [Canteri-Schemin](#) (۲۰۰۵)، [Pinheiro](#) (۲۰۰۸) و [Yapo](#) (۲۰۰۹) همگی تأکید کرده‌اند که استخراج پکتین با سیتریک اسید روشی نسبتاً دوستدار محیط‌زیست است که می‌تواند پکتین را با ایمنی بیشتر و کیفیت مناسب‌تر استخراج کند.

بیشتر پژوهشگران گزارش کرده‌اند که زمان استخراج با بازده استخراج پکتین رابطه‌ای مستقیم دارد؛ به گونه‌ای که با افزایش زمان تماس ماده اولیه با حلال، میزان پکتین استخراج شده نیز افزایش می‌یابد. نتایج این مطالعه نیز این الگو را تأیید کرد، به طوری که افزایش زمان استخراج موجب افزایش بازده شد (شکل‌های ۱a و ۱b). این یافته با گزارش‌های پیشین همسو است؛ برای نمونه، [Hosseini](#) و همکاران (۲۰۱۶) نیز بیان کردند که طولانی‌تر بودن زمان استخراج به نفع افزایش تولید پکتین است. براساس بازده پکتین به دست آمده در این تحقیق و مقایسه آن با بازده حاصل از استخراج به روش اسیدهای معدنی، می‌توان نتیجه گرفت که هرچند اسیدهای معدنی بازده استخراج پکتین را به طور چشم‌گیری افزایش می‌دهند، اما استفاده از آن‌ها با آسیب‌های زیست‌محیطی و افزایش هزینه‌های فرایند همراه است. افزون بر این، به کارگیری اسیدهای معدنی در دمای بالا می‌تواند موجب تخریب حرارتی پکتین شود که در نهایت به کاهش خواص عملکردی این پلی‌ساکارید منجر می‌گردد ([Mamiru & Gonfa, 2023](#)).

بیشترین و کمترین بازده استخراج پکتین به ترتیب مربوط به آزمایش‌های شماره ۱۰ (۵۳/۸ درصد) و ۱۱ (۸/۲۱ درصد) بوده است (جدول ۳). [Hosseini](#) و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از محلول آبی رقیق سیتریک اسید برای استخراج پکتین از پوست نارنج، گزارش کردند که بازده استخراج در pHهای پایین افزایش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های [Fissore](#) و همکاران (۲۰۱۰) نیز همسو است. آنان پکتین را

چشمگیری کاهش می یابد و این فرایند تشکیل پیوندهای هیدروژنی و شبکه ژلی را تسهیل می کند. از این رو، پکتین با متوکسیل بالا دارای پایداری ژلی بالا بوده و به طور گسترده در ژله ها، آبنبات های ژلاتینی، پرکننده های آبنبات و نوشیدنی های فرمول بندی شده با باکتری های لاکتیک اسید کاربرد دارد (Mellinas et al., 2020). در مقابل، پکتین های با درجه متوکسیل کم عمدتاً از یون های دو ظرفیتی معمولاً یون کلسیم، برای ایجاد ژل بهره می برند. در این نوع پکتین، ساکارز پل زنی کلسیمی بین یون های دو ظرفیتی و گروه های کربوکسیل جدا شده، به افزایش استحکام ژل کمک می کند. پکتین کم متوکسیل معمولاً در مرباهای کم قند یا بدون قند، محصولات کم اسیدی، دسرهای یخ زده و بستنی ها مورد استفاده قرار می گیرد (Hosseini et al., 2020). میزان درجه استری شدن پکتین استخراج شده در شرایط بهینه بازده (دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، زمان ۹۰ دقیقه و pH برابر با ۱) برابر با ۹/۱۳ درصد بود. این مقدار نشان می دهد که پکتین به دست آمده از پوست لیموترش را می توان در مصارفی که بازده استخراج اهمیت بیشتری دارد، در گروه پکتین های کم متوکسیل طبقه بندی کرد. این یافته همچنین تأکید می کند که رابطه مستقیمی میان بازده استخراج و درجه استری شدن وجود ندارد. با توجه به آنکه پکتین های با درجات مختلف استری شدن، کاربردهای متفاوتی دارند، پکتین استخراج شده در این پژوهش که با استفاده از اسید آلی (سیتریک اسید) به دست آمده است می تواند در تولید محصولات کم شکر مانند ژله ها و مرباهای کم کالری مورد استفاده قرار گیرد (Wai et al., 2010). همچنین، وجود مقدار بالایی از گروه های متوکسیل در ساختار این پکتین آن را برای تولید فیلم ها و پوشش های خوراکی نیز مناسب می سازد. نتایج این تحقیق با گزارش های Hosseini و همکاران (۲۰۱۶) و Yapo و همکاران (۲۰۰۸) همسو است؛ آنان نیز بیان کردند که درجه استری شدن با کاهش pH، کاهش می یابد. این پژوهشگران توضیح داده اند که در شرایط استخراج شدید مانند اسیدیته بالا، دمای زیاد و زمان طولانی، فرایند استرزدایی

گیاهی و انتقال آن به محیط استخراج را تسهیل می کند (Hossini et al., 2020). از سوی دیگر، زمان طولانی تر استخراج امکان نفوذ عمیق تر حلال اسیدی به ساختار سلولی و حل شدن بیشتر پکتین را فراهم می سازد، در حالی که دما عمدتاً بر انرژی جنبشی مولکول ها اثر دارد (Jesmin Akhter et al., 2024). سطح پاسخ در شکل ۱ که نسبتاً صاف و خطی است و فاقد خم شدگی های برجسته است، نشان می دهد که اثر متقابل زمان و pH عامل (BC) نیز معنی دار نیست (ضریب ۰/۰۳۴۱۷- در معادله ۵). بدین ترتیب، مشخص می شود که اثر زمان بر بازده مستقل از pH بوده و تعامل قابل توجهی میان این دو عامل وجود ندارد.

Gonfa و Mamiru (۲۰۲۳) گزارش کردند که بازده پکتین با افزایش زمان استخراج در بازه دمایی ۵۰ تا ۱۱۰ درجه سانتی گراد افزایش می یابد. نتایج این پژوهش نیز با یافته های مطالعات پیشین سازگاری دارد و تأیید می کند که در استخراج اسیدی پکتین، دو عامل pH و زمان از مهم ترین عوامل تأثیرگذار بر بازده محسوب می شوند (Jesmin Akhter et al., 2024; Adetunji et al., 2024).

درجه استری شدن (DE) بیانگر درصد گروه های استری موجود در ساختار پکتین است (Mellinas et al., 2020) و بر اساس آن، پکتین به دو گروه پکتین با درجه متوکسیل بالا ( $DE > 50\%$ ) و پکتین با درجه متوکسیل پایین ( $DE < 50\%$ ) طبقه بندی می شود. هر یک از این دو نوع پکتین، با توجه به میزان استری شدن، کاربردهای صنعتی متفاوتی دارند. در پکتین های با درجه متوکسیل بالا، فرم گیری ژل زمانی رخ می دهد که گروه های کربوکسیل بسیار هیدراته و باردار در محدوده pH بین ۲ تا ۳ به حالت فاقد بار تبدیل شوند. در این شرایط، جدایی گروه های کربوکسیل مهار شده و دافعه بین مولکولی کاهش می یابد؛ در نتیجه، مولکول ها فرصت برقراری پیوندهای بین مولکولی یافته و ساختار سه بعدی ژل شکل می گیرد (Pei et al., 2024). افزون بر این، در حضور غلظت های بالای ساکارز (۵۸ تا ۷۵٪)، حلالیت مولکول های پکتین خنثی به دلیل رقابت قند برای جذب آب به طور

هم‌زمان و هماهنگ کنترل شوند.

برخلاف نمودار pH-دما، در شکل ۲c نیز اثر متقابل معنی‌دار BC ( $P=0/0100$  در جدول ۶)، به‌وضوح قابل مشاهده است. سطح پاسخ نشان می‌دهد که شیب تغییرات درصد استری شدن در امتداد محور زمان در سطوح مختلف pH یکسان نیست. در pHهای پایین (شرایط اسیدی شدید)، افزایش زمان استخراج موجب کاهش بیشتر درصد استری شدن می‌شود؛ زیرا واکنش هیدرولیز گروه‌های متیل‌استر فرصت بیشتری برای پیشرفت پیدا می‌کند. در مقابل، در pHهای بالاتر (نزدیک به ۳)، زمان طولانی‌تر اثر بسیار کمتری بر کاهش استری شدن دارد، زیرا سرعت واکنش استرزدایی در این محیط آهسته‌تر است (*Pereira et al., 2016*). این رفتار با ضریب منفی عبارت تعاملی  $X_B X_C$  ( $-0/2333333$ ) در معادله (۴) سازگار است و نشان می‌دهد که افزایش هم‌زمان زمان و pH اثر منفی (هرچند محدود) بر درصد استری شدن دارد. افزون بر این، انحنا قابل‌ملاحظه در امتداد محور pH و انحنا ملایم‌تر در امتداد محور زمان مؤید معنی‌داری جملات درجه دوم  $C^2$  و  $B^2$  ( $P=0/0367$ ) در ANOVA است. این نتایج نشان می‌دهد که رابطه بین زمان و درصد استری شدن خطی نیست و احتمالاً یک نقطه یا ناحیه تعادلی وجود دارد که پس‌از آن، افزایش بیشتر زمان تأثیر محسوسی بر کاهش استری شدن نخواهد داشت. در مجموع، این الگو تأکید می‌کند که پیکربندی بهینه پارامترهای استخراج تنها در چارچوب بررسی هم‌زمان pH و زمان قابل‌دستیابی است.

گالاکتورونیک اسید واحد سازنده اصلی پکتیک اسید و جزء غالب ساختار پکتین است؛ از این رو، اندازه‌گیری دقیق آن برای تعیین خلوص پکتین اهمیت اساسی دارد. *Liu* و همکاران (۲۰۱۰) با ارزیابی محتوای گالاکتورونیک اسید پکتین استخراج شده از پوست درخت توت، گزارش کردند که با افزایش غلظت اسید، محتوای گالاکتورونیک اسید کاهش می‌یابد. آنان این کاهش را ناشی از افزایش توان هیدرولیز اسیدی دانستند که سبب آزادسازی و استخراج آسان‌تر

زنجیره پلی‌گالاکتورونیک اسید تشدید می‌شود و درجه استری شدن کاهش می‌یابد.

واکنش استرزدایی (حذف گروه‌های متیل‌استر) فرایند هیدرولیز اسیدی یا بازی است که شدت و سرعت آن به‌شدت وابسته به pH است (*Hosseini, Ma et al., 2013; et al., 2016*). در شرایطی که pH ثابت نگه‌داشته شود، افزایش دما یا زمان استخراج تنها می‌تواند تأثیر جزئی بر سرعت هیدرولیز داشته باشد و قادر نیست تعادل واکنش را به‌طور معنی‌داری جابه‌جا کند (شکل ۲a). این یافته از نظر کاربردی اهمیت دارد؛ بدین معنا که اگر هدف کنترل دقیق درصد استری شدن پکتین باشد، اتکا به تنظیم دما و زمان به‌تنهایی کافی نیست و تنظیم و کنترل دقیق pH شرط اساسی برای مدیریت این واکنش و دستیابی به ساختار مطلوب پکتین خواهد بود.

در شکل ۲b، وجود انحنای قابل‌توجه در امتداد محور pH نشان می‌دهد که رابطه میان pH و درجه استری شدن خطی نبوده و از یک الگوی درجه دوم پیروی می‌کند. این انحنا بیانگر آن است که تأثیر افزایش یک واحد pH در تمام محدوده‌ها یکسان نیست؛ به‌گونه‌ای که در pHهای پایین‌تر، تغییرات pH اثر قوی‌تری در کاهش سرعت استرزدایی دارد. افزون بر این، شیب ملایم اما قابل مشاهده محور دما نشان می‌دهد که دما نیز اثر ثانویه بر درجه استری شدن دارد. هرچند این تأثیر به‌تنهایی معنی‌دار نیست، اما در تعامل با pH می‌تواند نقش مؤثری در تغییرات ساختاری پکتین ایفا کند.

نکته کلیدی دیگر، اثر متقابل معنادار AC ( $P=0/0261$ ) در جدول ۶ است که در این شکل به‌وضوح قابل‌مشاهده است. شیب سطح در امتداد محور دما در سطوح مختلف pH یکسان نیست؛ به‌بیان‌دیگر، تأثیر دما بر درصد استری شدن به مقدار pH وابسته است و بلعکس. در pHهای پایین‌تر (محیط اسیدی شدید)، افزایش دما می‌تواند واکنش استرزدایی را تشدید کند، درحالی‌که در pHهای بالاتر این اثر بسیار کمتر است. این تعامل پیچیده نشان می‌دهد که برای دستیابی به درصد استری شدن مطلوب، لازم است pH و دما به‌صورت

محیط‌زیست به شمار می‌آید. تحلیل داده‌های تجربی با بهره‌گیری از روش سطح پاسخ و طرح باکس-بنکن نشان داد که مدل‌های درجه دوم، برازش بسیار مطلوبی برای هر سه پاسخ شامل بازده، درجه استری شدن و محتوای گالاکتورونیک‌اسید ارائه می‌دهند؛ به‌گونه‌ای که مقادیر بالای ضریب تعیین ( $R^2 > 0.98$ ) بیانگر توان بالای این مدل‌ها در تبیین رفتار سامانه استخراج بود. ارزیابی اثر عوامل فرایندی نیز نشان داد که pH مهم‌ترین متغیر تأثیرگذار بر هر سه ویژگی پکتین است؛ به‌طوری‌که کاهش pH موجب افزایش قابل توجه بازده شد، اما هم‌زمان با کاهش DE و GalA همراه بود. بیشینه بازده استخراج در شرایط اسیدی شدید ( $pH=1$ ) و زمان و دمای نسبتاً بالا به  $53/8$  درصد رسید، درحالی‌که بیشترین DE ( $61/11$  درصد) و بالاترین محتوای GalA ( $83/5$  درصد) در شرایط ملایم‌تر شامل pH نزدیک به ۳، مدت زمان کوتاه‌تر و دماهای متوسط حاصل شد. این الگو نشان می‌دهد که با تنظیم دقیق شرایط استخراج می‌توان پکتین کم‌متوکسیل یا پرمتوکسیل با سطوح مختلف خلوص تولید کرد که برای کاربردهای متفاوت مناسب خواهند بود. به‌طورکلی، یافته‌های این مطالعه کارآمدی استخراج اسیدی مبتنی بر سیتریک‌اسید و اثربخشی روش سطح پاسخ در طراحی و بهینه‌سازی فرایند را تأیید می‌کند. بهره‌برداری صنعتی از این رویکرد می‌تواند، ضمن کاهش ضایعات کشاورزی و کاهش اثرهای زیست‌محیطی ناشی از دفع آن‌ها، امکان تولید پکتین با ویژگی‌های قابل تنظیم را برای طیف گسترده‌ای از کاربردها شامل فیلم‌های بسته‌بندی، صنایع غذایی، دارویی و زیست‌فناوری فراهم نماید.

گلیکان‌های باقیمانده می‌شود و به‌طور غیرمستقیم خلوص گالاکتورونیک‌اسید کاهش می‌یابد. در مقابل،  $Ma$  و همکاران (۲۰۱۳) نتیجه‌ای معکوس گزارش کردند و تأثیر متفاوت شرایط استخراج را در تغییر محتوای گالاکتورونیک‌اسید نشان دادند. همچنین  $Oliveira$  و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که اسید می‌تواند مقدار قابل توجهی از گالاکتورونیک‌اسید را آزاد یا تجزیه کند و بدین ترتیب، با توجه به تغییرات شرایط استخراج، نتایج متفاوتی حاصل شود. علاوه بر این،  $Kurita$  و همکاران (۲۰۰۸) اشاره کردند که سیتریک‌اسید ممکن است موجب تخریب نواحی خطی هموگالاکتورونیک‌اسید شود که در نهایت به کاهش بازده گالاکتورونیک‌اسید منجر می‌شود. یافته‌های این پژوهش نیز نشان می‌دهد که باقیمانده سیتریک‌اسید می‌تواند یکی از عوامل مؤثر بر کاهش خلوص پکتین باشد. در همین راستا، این نتایج نیز نشان داد که در pH‌های پایین، خلوص پکتین کاهش می‌یابد.  $Wai$  و همکاران (۲۰۱۰) نیز تأکید کردند که بازده استخراج الزاماً بیانگر محتوای پلی‌ساکاریدی پکتین نیست. بازده بالاتر ممکن است ناشی از رسوب هم‌زمان ترکیبات دیگر طی رسوب‌دهی الکلی و وجود باقی‌مانده بیشتر سیتریک‌اسید باشد که در نهایت به پکتین با خلوص کمتر منجر می‌شود.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پوست لیموترش، منبعی کارآمد، در دسترس و پایدار برای تولید پکتین است. استفاده از سیتریک‌اسید به‌عنوان حلال استخراج، امکان استحصال پکتینی با بازده و کیفیت مناسب را فراهم نمود که در مقایسه با اسیدهای معدنی، رویکردی ایمن‌تر و سازگارتر با

## References

- Adetunji, L.R., Adekunle, A., Orsat, V. & Raghavan, V., 2017. Advances in the pectin production process using novel Extraction Techniques: a Review. *Food Hydrocolloids*, 62, 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.015>.
- Allian, M., Ramasaviny, B. & Emmambuk, M., 2020. Extraction, Characterisation, and Application of Pectin from Tropical and Sub-Tropical Fruits: A Review. *Food Reviews International*, <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1733008>.
- Canteri-Schemin, M.H., Fertoni, H.C., Waszczyński, N. & Wosiacki, G., 2005. Extraction of pectin from apple pomace, *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48 (2), 259–266, <https://doi.org/10.1590/s1516-89132005000200013>.
- Chalapud, M.C., Salgado-Cruz, Ma de., Bäuml, E.R., Carelli, A.A., Morales-Sanchez, E., Calderon-Domínguez, G. & García-Hernández, A.B., 2023. Study of the physical, chemical, and structural properties of low- and high-methoxyl pectin-based film matrices including Sunflower Waxes. *Membranes*, 13 (10), 846, <https://doi.org/10.3390/membranes13100846>.
- Chan, S.Y. & Choo, W.S. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chemistry*, 141, 3752–3758. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.097>.
- Chen, J., Liu, W., Liu, C. M., Li, T., Liang, R. H. & Luo, S. J., 2015. Pectin modifications A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12), 1684–1698. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.718722>.
- Dubey, P., Tripathi, G., Mir, S. S. & Yousuf, O., 2023. Current scenario and global perspectives of citrus fruit waste as a valuable resource for the development of food packaging film. *Trends in Food Science & Technology*, 141, Article 104190. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104190>.
- Durán-Aranguren, D.D., Ramírez, C.J., Díaz, L., Valderrama, M.A. & Sierra, R., 2022. Pectins – The New-Old Polysaccharides: Production of Pectin from Citrus Residues. *Process Alternatives and Insights on Its Integration under the Biorefinery Concept*, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.100153>.
- Ebrahim Zadeh, M. & Zadbakht, M., 2006. Extraction of Pectin and Comparison of Yield, Degree of Esterification and Percentage of Galacturonic Acid in the Skin of Some Citrus. *Magazine of Mazandaran University of Medical Sciences*, 16 (54), 52–59.
- Eça, K.S., Machado, M.T., Hubinger, M.D. & Menegalli, F.C., 2015. Development of active films from pectin and fruit extracts: light protection, antioxidant capacity, and compounds stability. *Journal Food Science*, 80 (11). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13074>.
- Fissore, E.N., Ponce, N.M., Escalada Pla, M., Stortz, C.A., Rojas, A.M. & Gerschenson, L.N., 2010. Characterization of acid-extracted pectin-enriched products obtained from Red Beet (*beta vulgaris* l. var. *conditiva*) and butternut (*cucurbita moschata* Duch ex Poir), *Journal Agricultural Food Chemical*, 58 (6), 3793–3800. <https://doi.org/10.1021/jf903844b>.
- Gharibzadeh, S.M., Smith, B. & Guo, Y., 2019. Ultrasound-microwave assisted extraction of pectin from fig (*ficus carica* L.) skin: optimization, characterization and bioactivity, *Carbohydrate Polymer*, 222, 114992. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.114992>.
- Hossain, Md., Ara, R., Yasmin, F., Suchi, M. & Zzaman, W., 2024. Microwave and ultrasound assisted extraction techniques with citric acid of pectin from Pomelo (*Citrus maxima*) peel. *Measurement: Food*, <https://doi.org/10.1016/j.meaf.2024.100135>.
- Hosseini, S.S., Khodaiya, F. & Yarmand, M., 2016. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.051>.
- Hosseini, S., Parastouei, K. & Khodaiyan, F., 2020. Simultaneous extraction optimization and characterization of pectin and phenolics from sour cherry pomace. *International Journal Biological Macromolecules*, 158, 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.241>.
- Jesmin Akhter, J., Sarkar, Sh., Tajnuba Sharmin, T. & Chandra Mondal, Sh., 2024. Extraction of pectin from powdered citrus peels using various acids: An analysis contrasting orange with lime. *Applied Food Research*, 4, 100614. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100614>.
- Kurita, O., Fujiwara, T. & Yamazaki, E., 2008. Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. *Carbohydrate Polymer*, 74 (3), 725–730, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.033>.
- Lasunon, P. & Sengkhampan, N., 2022. Effect of ultrasound-assisted, microwave-assisted and ultrasound-microwave-assisted extraction on pectin extraction from industrial tomato waste, *Molecules*, 27 (4), 1157. <https://doi.org/10.3390/molecules27041157>.

- Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y. & Yao, J., 2010. Extraction of pectins with different degrees of esterification from Mulberry Branch bark. *Bioresource Technological*, 101 (9), 3268–3273. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.062>.
- Ma, S., Yu, S., Zheng, X., Wang, X., Bao, Q & Guo, X., 2013. Extraction, characterization and spontaneous emulsifying properties of pectin from Sugar Beet Pulp. *Carbohydrate Polymer*, 98 (1), 750–753. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.042>.
- Mahmud, M.M., Belal, M., Ahmed, S. & Hoque, M.M., 2021. Zzaman, Microwave-assisted extraction and characterization of pectin from citrus fruit wastes for commercial application. *Food Resource*, 5 (5), 80–88. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(5\).592](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(5).592).
- Mamiru, D. & Gonfa, G., 2023. Extraction and characterization of pectin from watermelon rind using acetic acid. *Heliyon*, 9, 13525. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13525>.
- Martau, G.A., Mihai, M. & Vodnar, D.C., 2019. The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector—biocompatibility, bio adhesiveness and biodegradability. *Polymers*, 11 (11), 1837. <https://doi.org/10.3390/polym11111837>.
- Marwa Mahmoud, F.M. Abu-Salem, D.E. & Azab., 2022. A comparative study of pectin green extraction methods from Apple Waste: characterization and functional properties. *SSRN Electron. Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4005101>.
- Mendes, J.F., Norcino, L.B., Manrich, A., Pinheiro, A.C.M., Oliveira, J.E. and Mattoso, L.H.C. (2020). Characterization of pectin films integrated with cocoa butter by continuous casting: Physical, thermal and barrier properties. *Journal Polymer. Environmental*. 28:2905–2917. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01829-1>.
- Mellinas, C., Ramos, M., Jimenez, A. & Garrigos, M.C., 2020. Recent trends in the use of pectin from agro-waste residues as a natural-based biopolymer for food packaging applications. *Materials*, 13 (3), 673. <https://doi.org/10.3390/ma13030673>.
- Mosayebi, V. & Emam Djomeh, Z., 2017. Optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from black mulberry (*Morus nigra*.L) pomace. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 13 (4), 594-610. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.50466>.
- Oliveira, T.T., Rosa, M.F., Cavalcante, F.L., Pereira, P.H., Moates, G.K., Wellner, N., Mazzetto, S.E., Waldron, K.W. & Azeredo, H.M.C., 2016. Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemical*, 198, 113–118, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.080>.
- Panahirad, P., Dadpour, M., Peighambaroust, S.H., Soltanzadeh, M., Gullón, B., Alirezalu, K. and Lorenzo, M. 2021. Applications of carboxymethyl cellulose- and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 110:663-673. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.025>.
- Pei, Ch., Hsien, T, Sh., Hsuan, F, Sh., Hsuan, H, L., Chi, Ch. & Yi, M, L., 2024. Microwave- and Ultrasound-Assisted Extraction of Pectin Yield and Physicochemical Properties from Lemon Peel. *Journal of Agriculture and Food Research*, <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101009>.
- Pereira, P.H., Oliveira, T.T. N., Waldron, W. & Azeredo. H.M.C., 2016. Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. *International Journal Biological Macromolecul*, 88, 373–379, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.074>.
- Pinheiro, E.R., Silva, I.M.D.A., Gonzaga, L.V., Amante, E.R., Te'ofilo, R.F., Ferreira, M.M. C. & Amboni, R.D.M.C., 2008. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 99 (13), 5561–5566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.058>.
- Wai, W.W., Alkarkhi, A.F.M. & Easa, A.M., 2010. Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of Durian Rind pectin: an experimental design. *Food Bioproduction Process*, 88 (2–3), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.01.010>.
- Xu, F., Zhang, S., Waterhouse, G. I. N., Zhou, T., Du, Y., Sun-Waterhouse, D. & Wu, P., 2022. Yeast fermentation of apple and grape pomaces affects subsequent aqueous pectin extraction: Composition, structure, functional and antioxidant properties of pectins. *Food Hydrocolloid*, 133,107945. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107945>.
- Yapo, B.M., Robert, C., Etienne, I., Wathélet, B. & Paquot, M., 2008. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemical*, 100 (4), 1356–1364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.012>.