

Investigating the Extraction of Carrageenan from Red Algae *Kappaphycus alvarezii* and Its Purification Process for Use in Food Products

Pages
57-74

S. Tajikesmaili¹, M. Javanmarddakhrl², H. Fakhim³ and H. Javanmarddakhrl⁴

- 1) Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Khwarazmi University, Tehran, Iran.
2 & 4) Food Technologies Group. Institute of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.
3) R&D, Zarin Gol Arya Fanavar Co, Tehran, Iran.

*Corresponding author: javanmard@irost.ir

Received date: 2023.08.30

Accepted date: 2023.12.05

Abstract

Carrageenan is a type of polysaccharide that is widely used in the food and beverage, and pharmaceutical industries, and the methods of optimizing its extraction are very important. The purpose of this research is to extract kappa carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* algae and to investigate the factors influencing the various characteristics of carrageenan. In this research, kappa-carrageenan was extracted using different methods, including extraction with potassium chloride and calcium hydroxide, extraction with isopropyl alcohol and extraction by spray drying method. Quantitative and qualitative characteristics of kappa carrageenan including color, pH, moisture content, total ash, acid insoluble ash, sulfate content, water absorption capacity, minimum gelation concentration, gel strength, syneresis, viscosity, efficiency, total microorganism count, morphology and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were investigated. Based on FTIR, the highest similarity between the different kappa carrageenan samples extracted in this study with the commercial sample was observed with the extraction method using 6% potassium hydroxide, with an extraction efficiency of 34.84% which is desirable. Additionally, the microorganism count test with the result of 1500 Cfu/g indicated a high level of gel purity and the possibility of its use in food products. Extraction with 6% potassium hydroxide, besides the high extraction efficiency, showed a very high structural similarity to the commercial sample. On the other hand, all the evaluated quantitative and qualitative characteristics of the extracted kappa-carrageenan fully complied with the relevant standards, and therefore, the use of this method in extraction is recommended.

Keywords: Kappa carrageenan, Extraction, Optimization and Physicochemical properties

بررسی استخراج کاراگینان از جلبک قرمز *Kappaphycus alvarezii* و فرآیند تصفیه آن به منظور استفاده در

فرآورده‌های غذایی

شماره صفحات

۷۴-۵۷

سیمین تاجیک اسمعیلی^۱، مجید جوانمرد داخلی^{۲*}، حسن فخیم^۳ و هیلا جوانمرد داخلی^۴

(۱) گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

(۲ و ۴) گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

(۳) واحد تحقیق و توسعه شرکت زرین گل آریا فن آور، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: javanmard@irost.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۸

چکیده

کاراگینان نوعی پلی ساکارید است که در صنایع غذایی و آشامیدنی و داروسازی بسیار کاربرد دارد و روش‌های بهینه‌سازی استخراج آن دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. هدف از این پژوهش، استخراج کاپا کاراگینان از جلبک *Kappaphycus alvarezii* و بررسی عوامل تاثیرگذار بر ویژگی‌های مختلف کاراگینان می‌باشد. در این تحقیق، استخراج کاپا-کاراگینان به روش‌های مختلفی شامل استخراج با پتاسیم کلراید و کلسیم هیدروکساید، استخراج با ایزوپروپیل الکل و تولید آن به روش خشک کن پاششی انجام گردید. ویژگی‌های کمی و کیفی کاپا کاراگینان شامل رنگ، pH، رطوبت، خاکستر کل، خاکستر نامحلول در اسید، محتوای سولفات، ظرفیت جذب آب، حداقل غلظت زله‌ای شدن، استحکام ژل، سینرسیس، ویسکوزیته، بازده، شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، مورفولوژی و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ، بالاترین میزان مشابهت مابین انواع نمونه های کاپا کاراگینان استخراج شده در این پژوهش با نمونه تجاری، در روش استخراج با پتاسیم هیدروکساید ۶٪ مشاهده گردید و بازده استخراج در این روش برابر با ۳۴/۸۴٪ به دست آمد که مطلوب می‌باشد. همچنین آزمون شمارش میکروارگانیسم‌ها با نتیجه ۱۵۰۰ Cfu/g، حکایت از سطح بالای تمیزی ژل و امکان بکارگیری آن در محصولات غذایی داشت. استخراج با پتاسیم هیدروکساید ۶٪ علاوه بر بازده استخراج بالا، مشابهت ساختاری بسیار بالایی با نمونه تجاری دارد. از سوی دیگر، کلیه ویژگی‌های کمی و کیفی ارزیابی شده کاپا کاراگینان استخراج شده تطابق کاملی با استانداردهای مربوطه داشته و لذا کاربرد این روش در استخراج پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کاپا کاراگینان، استخراج، بهینه‌سازی و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی.

مقدمه

کاراگینان^۱ نوعی پلی‌ساکارید است که در گونه‌های خاصی از جلبک‌های دریایی قرمز^۲ وجود داشته و به طور گسترده در صنایع مختلف به ویژه صنعت تولید غذا کاربرد دارد (Bono *et al.*, 2014). پس از نشاسته و ژلاتین، کاراگینان سومین هیدروکلوئید مهم و پرکاربرد در جهان است (Mustapha *et al.*, 2011). بر اساس حلالیت این ترکیب در پتاسیم کلراید کاراگینان به انواع μ ، ϵ ، λ ، κ ، ι و ν طبقه‌بندی می‌شود که همگی شامل ۲۲ تا ۳۵ درصد گروه‌های سولفات هستند (Montolulu *et al.*, 2008). تفاوت در درصد استر سولفات بر روی استحکام ژل، بافت، حلالیت و دماهای ذوب آن تاثیرگذار است. سطوح بالاتر استر سولفات به معنای دمای حلالیت و استحکام پایین‌تر آن است (Imeson *et al.*, 2009). در صنعت سه دسته اصلی و تجاری کاراگینان شامل کاپا (K)، آیوتا (I) و لامبدا (λ) می‌باشد (Mangione *et al.*, 2003). میزان استر سولفات در لامبدا کاراگینان بیشتر است (Barbeyron *et al.*, 2000; Campo *et al.*, 2009). ژل حاصل از کاپا کاراگینان سفت و قوی بوده و در مقابل، آیوتا کاراگینان ژل نرم تولید می‌کند (Hotchkiss *et al.*, 2016). جلبک قرمز *K. alvarzii* یکی از مهمترین منابع کاراگینان است که به شکل گیاهی خردار و بوته‌ای است و در دیواره سلولی آن حاوی این ماده می‌باشد (Jum'at *et al.*, 2024) و کاراگینان حاصل از آن بیشتر از ۹۰٪ از نوع کاپا و کمتر از ۱۰٪ از نوع آیوتا است. میزان بالای کاپا کاراگینان، اهمیت تجاری فراوانی به این جلبک بخشیده است (Lee *et al.*, 2008). این جلبک علاوه بر رشد طبیعی در قسمت‌های داخلی برخی از صخره‌های مرجانی، به طور گسترده در کشورهای جنوب شرقی آسیا مانند مالزی و فیلیپین، تانزانیا، ونزوئلا، مکزیک، برزیل، هند و فیجی معرفی و کشت شده است (Bono *et al.*, 2011; Ilias *et al.*, 2011). به دلیل افزایش تقاضا برای مصرف کاراگینان تولید این جلبک‌ها از ۹۴۴ هزار تن در سال ۲۰۰۰ به ۵/۶ میلیون تن در سال ۲۰۱۰ رسید (Cai *et al.*, 2013; Bixler and Porse, 2014). کاراگینان به دلیل غیر سمی بودن و زیست‌سازگاری و از طرف دیگر به علت توانایی تشکیل ژل‌های برگشت‌پذیر حرارتی و محلول‌های بسیار ویسکوز، در صنایع تولید غذا به طور گسترده به عنوان تغلیظ‌کننده، عامل ژل‌کننده و امولسیفایر به کار می‌رود. در حوزه محصولات گوشتی و لبنی، مشخصاً مصرف ۷۰ تا ۸۰٪ کل کاراگینان تولیدی در جهان را به خود اختصاص داده است (Hilliou *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2024). کاراگینان در سیستم دارورسانی و درمان در طراحی میکروکپسول‌ها و میکروژل‌ها توسط انکپسوله کردن^۳ ترکیبات زیست‌فعال^۴ مورد مطالعه قرار گرفته است (Ellis *et al.*, 2009; Keppeler *et al.*, 2009). همچنین در پزشکی تجربی کاراگینان اغلب برای آزمایش عوامل ضدالتهابی به کار می‌رود (Necas *et al.*, 2013). علاوه بر مصارف کاراگینان می‌توان به استفاده در صنایع

¹ Carrageenan

² Red Algae

³ Encapsulation

⁴ Bioactive Compounds

چاپ و نساجی، صنایع تولید محصولات آرایشی، فیلم‌های عکاسی، ژل‌های مطبوع کننده هوا و تصفیه پساب‌های صنعتی اشاره کرد (Manuhara et al., 2016; Firdayanti et al., 2023; Campo et al., 2009). کاپا کاراگینان یکی از پرمعامله ترین هیدروکلونیدهای مشتق شده از دریا است که در صنایع غذایی و آشامیدنی، داروسازی و مراقبت شخصی/آرایشی استفاده می شود اما استخراج مناسب و با کیفیت این محصول می تواند در بخش محصولات بهداشتی و دارویی پر اهمیت باشد (Nurani et al., 2024). یکی از مسائل مهم در تولید جلبک بازدهی استخراج آن است. استخراج با کمک محلول‌های پتاسیم هیدروکساید ۸، ۴ و ۱۲٪ نشان داد که نمونه‌های مربوط از نظر رطوبت، خاکستر، خاکستر نامحلول در اسید و سولفات متفاوت بوده است (Diharmi et al. 2020). سه عامل آب، دما و مدت زمان استخراج به طرز معنی‌داری بر تولید کاراگینان حاصل اثرگذار هستند (Nurimah et al., 2017). ساختار پلیمری کاراگینان‌ها در برابر هیدرولیز اسید-کاتالیست مستعد تجزیه است. در دمای بالا و pH پایین، این فرآیند ممکن است سریعاً به از بین رفتن عملکرد کاراگینان منجر شود (Stanley, 2011). روش‌های مرسوم استخراج کاراگینان به دلیل نیاز به دماهای بالا و تصفیه با قلیا آن هم برای یک بازه زمانی طولانی، اثرات نامطلوب زیست‌محیطی و مصرف قابل توجه انرژی را دنبال دارند. بنابراین لازم است این فرآیند جهت کاهش اثرات زیست‌محیطی اصلاح شود و با یک فرآیند سریع، مؤثر و دوست‌دار محیط زیست که بالاترین میزان بازده ممکن را هم داشته باشد جایگزین گردد (Hernandez-Carmona et al., 2013; Das et al., 2021). با توجه به اهمیت بهینه سازی استخراج کاراگینان این مطالعه با هدف ارزیابی اثر روش‌های مختلف استخراج و عوامل تاثیرگذار بر ویژگی‌های مختلف کاراگینان انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از جلبک قرمز *K. alvarezii* وارداتی از کشور فیلیپین (مارسل فیلیپین) تهیه شد و همچنین از ترکیبات شیمیایی شرکت Merck آلمان استفاده شد.

روش‌های استخراج کاراگینان

استخراج کاراگینان با پتاسیم کلراید و کلسیم هیدروکساید

به منظور استخراج کاراگینان به این روش پس از شستشو جلبک قرمز خشک شده با آب جاری و خیساندن، جلبک با قیچی بریده شده و با استفاده از مخلوط‌کن به پالپ تبدیل گردید. پالپ به دست آمده با نسبت ۱ به ۸۰ (v/v) با آب مخلوط و سپس استخراج کاراگینان تحت شرایط قلیایی (pH=۹) توسط محلول Ca(OH)_2 و گرم کردن در دمای 90°C با هم زدن مداوم انجام شد. پس از دو ساعت حرارت‌دهی، ضایعات جلبک (مواد جامد) توسط فیلتر جدا گردید و در ادامه با محلول HCl ۱٪ تا pH=۷ خنثی و در دمای 60°C به مدت ۳۰ دقیقه تحت حرارت قرار گرفت. در مرحله بعد، محلول KCl ۱٪ (مطابق با نتایج آزمون‌های اولیه، غلظت ۱٪ مناسب بود) با نسبت ۱:۱ اضافه و به طور مداوم به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط گردید. در ادامه

به منظور جداسازی ژل کاراگینان، مخلوط نهایی فیلتر شده و ژل حاصل به مدت یک ساعت در الکل ۹۶٪ همزده شد. کاراگینان حاصل شده پس از فیلتراسیون در دمای 70°C به مدت ۲۴ ساعت خشک و آسیاب گردید و در انتها از مش ۸۰ عبور داده شد (Manuhara et al., 2016) (شکل ۱).



شکل ۱: الف - استخراج کاراگینان با پتاسیم کلراید و کلسیم هیدروکساید ب - شستشو و خیساندن جلبک، آماده سازی ج - کوآگولاسیون با پتاسیم کلراید د - فیلتراسیون ژل ه - پودر صمغ کاپاکاراگینان.

استخراج کاراگینان با پتاسیم کلراید و پتاسیم هیدروکساید

در ابتدا جلبک خشک شده پس از شستشو با آب به مدت یک ساعت در آب خیسانده شد. پس از خیساندن، در مرحله بعد جلبک در دمای 85°C به مدت دو ساعت در پتاسیم هیدروکساید ۶٪ با نسبت ۱ به ۲۵ غوطه‌ور گردید. بعد از شستشو با آب و رسیدن به pH ۸ تا ۹، استخراج کاراگینان در آب در دمای 85°C به مدت دو ساعت با نسبت جلبک به آب برابر با ۱ به ۲۵ صورت گرفت. پس از صاف کردن، کوآگولاسیون با افزودن پتاسیم کلراید ۱٪ با نسبت محلول به اسید برابر با ۱ به ۱ انجام شد. ژل حاصل پس از صاف کردن، هم با الکل و هم بدون الکل (فیلتر پرس) آب‌گیری گردید. سپس کاراگینان حاصل در دمای 65 تا 70 درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب شده و در نهایت از صافی با مش ۸۰ عبور داده شد.

استخراج کاراگینان با ایزوپروپیل الکل

از آن جایی که در برخی از منابع جایگزین نمودن قلیا با الکل پیشنهاد شده بود لذا در این روش در مرحله کوآگولاسیون به جای پتاسیم کلراید از ایزوپروپیل الکل استفاده شد. پس از صاف کردن، کوآگولاسیون با افزودن پتاسیم کلراید ۱٪ با نسبت محلول به اسید برابر با ۱ به ۱ انجام شد. ژل حاصل پس از صاف کردن، با الکل آب‌گیری گردید. سپس کاراگینان حاصل در دمای 65 تا 70 درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب شده و در نهایت از صافی با مش ۸۰ عبور داده شد.

تولید کاراگینان به روش خشک‌کن پاششی

ابتدا مقداری جلبک خشک با آب شسته شد تا غلظت نمک و املاح کاهش یابد. سپس ۱۰ گرم نمونه در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱ ساعت خیسانده و در ادامه با مخلوط‌کن آسیاب شد. این محلول در حمام آب ($85-90^{\circ}\text{C}$) قرار گرفت و ۱۵ دقیقه قبل از پایان فرآیند، ۲۵ گرم خاک دیاتومه جهت کمک به فیلتراسیون، به محلول اضافه گردید. در ادامه، جداسازی عصاره خام کاراگینان از باقی مانده (سلولز) با استفاده از فیلتراسیون خلاء انجام شد و با استفاده از خشک‌کن پاششی، پودر عصاره خام

کاراگینان بدست آمد (Webber *et al.*, 2012) پارامترهای خشک‌کن پاششی شامل، دمای ورودی ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد، جریان هوا ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه، ظرفیت اسپری ۱۰۰ درصد و ظرفیت پمپ ۲۵ درصد بودند. شرایط بهینه استخراج برابر با ۷۴ درجه سانتی‌گراد و ۴ ساعت برآورد گردید.

ارزیابی ویژگی‌های کمی

pH و رطوبت

به منظور بررسی pH، محلول ۱٪ (w/v) کاپا کاراگینان تهیه و مقادیر pH در دمای اتاق (۲۵°C) اندازه‌گیری شد (Chan *et al.*, 2013) به منظور ارزیابی رطوبت، مقدار ۰/۵ گرم از پودر کاپا کاراگینان به کمک ترازوی دیجیتالی توزین و به مدت حداقل ۵ ساعت در آن با دمای ۱۰۵°C قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد، سپس مقدار رطوبت از رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$\text{رابطه ۱:} \quad \text{رطوبت} = \frac{\text{وزن اولیه نمونه} - \text{وزن نمونه بعد از خشک کردن}}{\text{وزن اولیه نمونه}} \times 100$$

خاکستر نامحلول در اسید

ابتدا خاکستر حاصل گردید و سپس اسید کلریدریک رقیق به آن افزوده و به مدت ۴۵ دقیقه روی حمام بخار حرارت داده شد. در ادامه از روی یک کاغذ صافی بدون خاکستر عبور داده شده و باقی‌مانده مواد، چندین نوبت با آب مقطر شسته شده و به کاغذ صافی منتقل گردید، ماده حاصل خشک شده و دوباره خاکستر گرفته تهیه شد. درصد خاکستر نامحلول در اسید از رابطه ۲ محاسبه گردید (Bianchi *et al.*, 2022).

$$\text{رابطه ۲:} \quad \text{خاکستر نامحلول در اسید} = \frac{\text{وزن مواد باقی مانده در بوته}}{\text{وزن نمونه خشک اولیه}} \times 100$$

خاکستر کل

پس از توزین مقدار مشخصی از پودر صمغ درون بوته چینی، بوته حاوی نمونه روی شعله مستقیم آتش سوزانده شده و سپس در کوره با دمای ۵۵۰°C برای حداقل ۵ ساعت نگه داشته شد تا خاکستر کاملاً سفید رنگی ظاهر گردد. خاکستر کل بر اساس رابطه ۳ محاسبه می‌شود:

$$\text{رابطه ۳:} \quad \text{خاکستر کل} = \frac{\text{وزن خاکستر}}{\text{وزن اولیه نمونه}} \times 100$$

محتوای سولفات کل

به ۱۵ گرم از نمونه، ۲۰ mm آب مقطر و ۲ mm هیدروکلریک اسید ۶M افزوده، به محلول در دمای جوش ۱۵mm باریوم کلراید ۰/۱M اضافه شد. پس از تشکیل رسوب، بشر به مدت ۱۵ دقیقه درون حمام آب گرم حرارت داده شده و سپس به دمای محیط رسید. محلول گرم حاوی رسوب، روی یک کاغذ صافی بدون خاکستر صاف و پس از خشک کردن، رسوب حاصل توزین شد.

ظرفیت جذب آب

نخست یک محلول ۱/۵ درصدی (وزنی/حجمی) از صمغ در آب مقطر تهیه و پس از جذب آب، تحت سانتریفیوژ قرار گرفت (۱۶۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه). پس از حذف مایع زلال فوقانی، ژل متورم باقی مانده وزن شد. مقدار ظرفیت جذب آب بر حسب g/g به کمک رابطه ۴ به دست آمد:

$$\text{رابطه ۴:} \quad \text{ظرفیت جذب آب} = \frac{\text{وزن ژل متورم} - \text{وزن نمونه اولیه}}{\text{وزن نمونه اولیه}} \times 100$$

استحکام ژل

به طور خلاصه محلول ۱/۵٪ کاراگینان تهیه و با همزن مغناطیسی، در دمای ۹۰°C به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه هم زده شد سپس، ۵۰ mm از محلول پس خنک شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط نگهداری شد. بافت‌سنج TA-XT plus (Stable Micro Systems, England) برای ارزیابی تراکم‌پذیری مورد استفاده قرار گرفت. حداکثر نیروی مورد استفاده ۵ ± ۰/۱ کیلوگرم بود. پروب دستگاه به عمق ۱۵mm با سرعت ۲mm/s در نمونه فشرده شد.

شمارش کلی میکروارگانیزم‌ها

هفت رقت از نمونه کاراگینان تولیدی تهیه و از هر رقت ۱mm به پلیت منتقل شد، سپس بر روی آن محیط کشت پلیت کانت آگار ریخته و با حرکت دورانی، محلول و محیط کشت مخلوط شدند. ظرف ها در آن ۳۷°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری و سپس تعداد کلنی ها شمارش شد (Chan et al., 2013).

ارزیابی ویژگی های کیفی

رنگ

رنگ پودر نمونه کاپا کاراگینان با استفاده از دستگاه هانتر لب (Laboratory Inc., Reston, USA Hunter Associate) اندازه گیری شد عدد ۱۰۰ نشان دهنده رنگ سفید و صفر بیانگر رنگ سیاه بود.

ویسکوزیته

معمولاً برای محلول کاراگینان با غلظت ۱/۵ درصدی (وزنی/حجمی) و در دمای ۷۵°C اندازه‌گیری می‌شود (Manuhara *et al.*, 2016). در این تحقیق ابتدا محلول با غلظت و دمای اشاره شده تهیه و سپس ویسکوزیته آن توسط اسپیندل شماره ۱ و با دور ۵۹rpm اندازه‌گیری گردید. علاوه بر نمونه استخراجی، ویسکوزیته یک نمونه تجاری نیز اندازه‌گیری شد.

ویسکوزیته

این ویژگی معمولاً برای محلول کاراگینان با غلظت ۱/۵٪ و در دمای ۷۵°C اندازه‌گیری می‌شود (۵۵). در این تحقیق، ویسکوزیته ژل توسط ویسکومتر اندازه‌گیری شد، به این صورت که ابتدا محلول با غلظت و دمای اشاره شده تهیه و سپس ویسکوزیته آن توسط اسپیندل شماره ۱ و با دور ۵۹rpm اندازه‌گیری گردید. علاوه بر نمونه استخراجی، ویسکوزیته یک نمونه تجاری نیز اندازه‌گیری شد.

بازده استخراج

بازده استخراج از رابطه ۵ دست آمد (Ilias *et al.*, 2017).

$$\text{رابطه ۵:} \quad \text{بازده استخراج} = \frac{\text{وزن کاراگینان استخراجی}}{\text{وزن جلبک خشک مورد استفاده}} \times 100$$

حداقل غلظت ژله‌ای شدن

در ابتدا تعلیق‌های ۱، ۲، ۳ و ۵٪ (v/w) از پودر صمغ در آب مقطر تهیه و پس از هیدراته شدن و انتقال ۲۰mm از آن‌ها به فالکون، برای مدت ۱ ساعت در حمام آب جوش (۱۰۰°C) قرار گرفت و پس از آن نمونه‌ها سرد شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴°C سانتی‌گراد قرار داشته شد. با عمود کردن فالکون‌ها برای مدت زمان ۱ دقیقه جهت آزمودن قابلیت جاری شدن، بررسی گردید. این آزمون همچنین جهت مقایسه بر روی نمونه تجاری نیز انجام گرفت.

سینرسیس

برای سینرسیس محلول ۱٪ (w/v) کاپا کاراگینان تهیه و به صورت ژل آماده شد و به مدت ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ روز در دمای اتاق داخل ظروف پتری قرار گرفت. در فواصل زمانی معین (روزها)، آبی که روی دیواره‌های ظرف متراکم شده بود با دستمال برداشته شد. وزن ژل اولیه در مدت زمان مشخص ثبت و سینرسیس از رابطه زیر محاسبه گردید (Chan *et al.*, 2013).

$$\text{رابطه ۶} \quad \text{سینرسیس} = \frac{\text{وزن ثانویه} - \text{وزن اولیه}}{\text{وزن اولیه}} \times 100$$

ساختار مورفولوژیک و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ^۵ (FTIR)

برای مشاهده ساختار کاپا کاراگینان استخراجی، از میکروسکوپ الکترونی روبشی در مقیاس میکرو استفاده شد. همچنین تجزیه و تحلیل نمونه‌های کاراگینان به روش طیف‌سنجی فروسرخ (Spectrum GX, USA) با استفاده از دیسک KBr در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ انجام شد (Webber et al., 2012).

نتایج

ارزیابی ویژگی‌های کمی

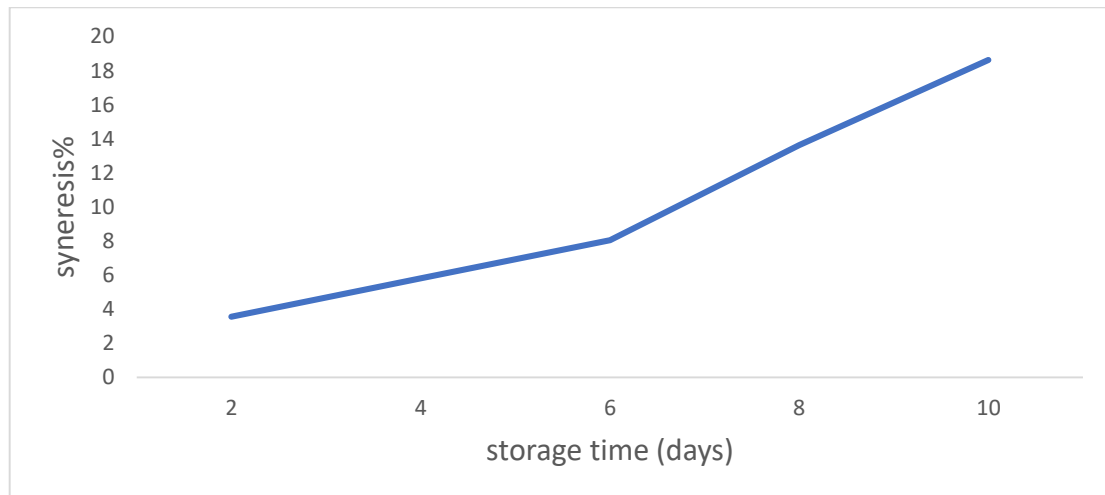
pH نمونه کاپا کاراگینان استخراج شده در این پژوهش معادل ۸ بود. رطوبت برابر با ۱۰٪ و خاکستر کاپا کاراگینان استخراج شده در این پژوهش معادل ۲۸/۵۷٪ بود که در محدوده استاندارد قرار دارد. خاکستر نامحلول در اسید در نمونه برابر با ۰/۷۸٪ بود، استحکام ژل برای کاراگینان 1417 g/cm^2 به دست آمد. محتوای سولفات، برابر با ۲۵/۷۸٪ بود و ظرفیت جذب آب برابر با ۶۲/۶۴٪ اندازه‌گیری شد. تعداد کلنی در رقت دوم نمونه دیده شد. در جدول ۱ نتایج تعدادی از آزمون‌های مربوط به ویژگی‌های کمی نمونه تجاری کاپا کاراگینان به همراه استاندارد مربوطه آورده شده است.

جدول ۱: ویژگی‌های کمی کاپا کاراگینان استخراج شده به همراه استاندارد ملی شماره ۱۹۰۳۳.

ویژگی	استاندارد	آزمایش
pH	۸-۱۱	۸
رطوبت	حداکثر ۱۲٪	۱۰٪
خاکستر کل	۱۵-۴۰٪	۲۸/۵۷٪
خاکستر نامحلول در اسید	حداکثر ۱٪	۰/۷۸٪
سولفات کل	۲۰-۴۰٪	۲۵/۷۸٪
ظرفیت جذب آب	۶۰/۵۴٪	۶۲/۶۴٪
استحکام ژل (۱/۵) (w/w)	حداقل $1300 \text{ (g/cm}^2)$	$1417 \text{ (g/cm}^2)$
شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	حداکثر 5000 CfU/g	1500 CfU/g

رنگ کاپا کاراگینان استخراج شده در این پژوهش $88/60$ بود که در محدوده استاندارد مربوطه (حداقل ۷۵) بود. حداقل غلظت مناسب برای تشکیل ژل استخراجی، ۱٪ بود در این پژوهش، سینرسیس ژل کاپا کاراگینان به طور قابل توجهی با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت و پس از ۱۰ روز نگهداری به $18/63$ رسید (شکل ۳) میزان ویسکوزیته برابر با $48/2 \text{ cp}$ بود. در این آزمایش همچنین بازده به روش غوطه‌وری در پتاسیم هیدروکسید ۶٪ برابر با $34/84$ ٪ ارزیابی گردید. در جدول ۲ نتایج تعدادی از آزمون‌های مربوط به ویژگی‌های کیفی نمونه تجاری کاپا کاراگینان به همراه استاندارد آورده شده است.

⁵ Fourier-Transform Infrared Spectroscopy



شکل ۲: سینرسیس نمونه بهینه کاپا-کاراگینان استخراجی.

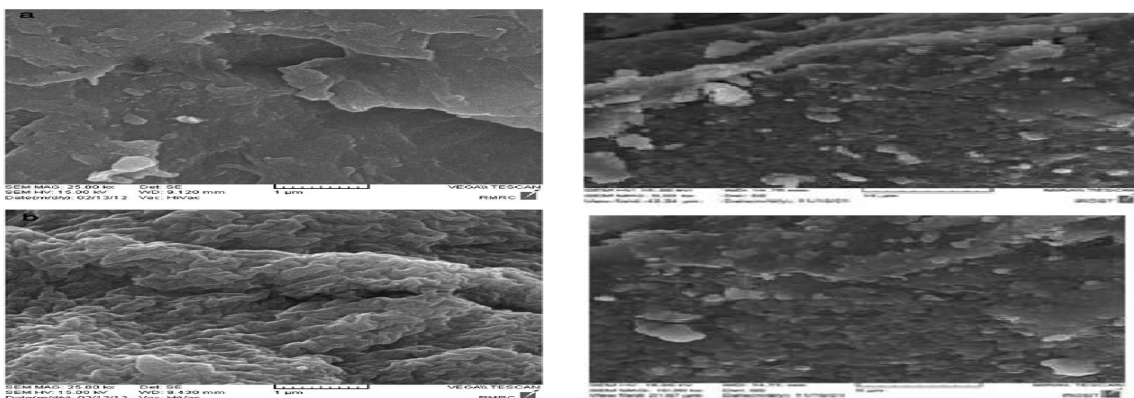
جدول ۲: برخی ویژگی‌های کیفی کاپا کاراگینان استخراج شده به همراه استاندارد ملی شماره ۱۹۰۳۳.

ویژگی	استاندارد	آزمایش
ظاهر	پودر سفید	مطابقت دارد
اندازه ذرات	حداقل ۹۵٪ پودر از مش ۱۲۰ عبور کند.	مطابقت دارد
رنگ (L*)	حداقل ۷۵	۸۸/۶۰
حداقل غلظت ژله‌ای شدن	-	کمتر از ۱٪ (مقاومت خوب)
سینرسیس	-	٪۱۸/۶۳
ویسکوزیته	حداقل ۵ cp	۴/۲ cp
بازده	٪۳۵ تا ۱۸	٪۳۴/۸۴

ساختار مورفولوژیک

مطابق تصاویر شکل ۴، تصویر میکروسکوپ الکترونی ریز ساختار پودر کاپا کاراگینان تجاری سطح تقریباً صافی داشت.

نمونه کاپا کاراگینان استخراجی شکل امورف، نامنظم و توزیع غیر یکنواخت را نشان داد.



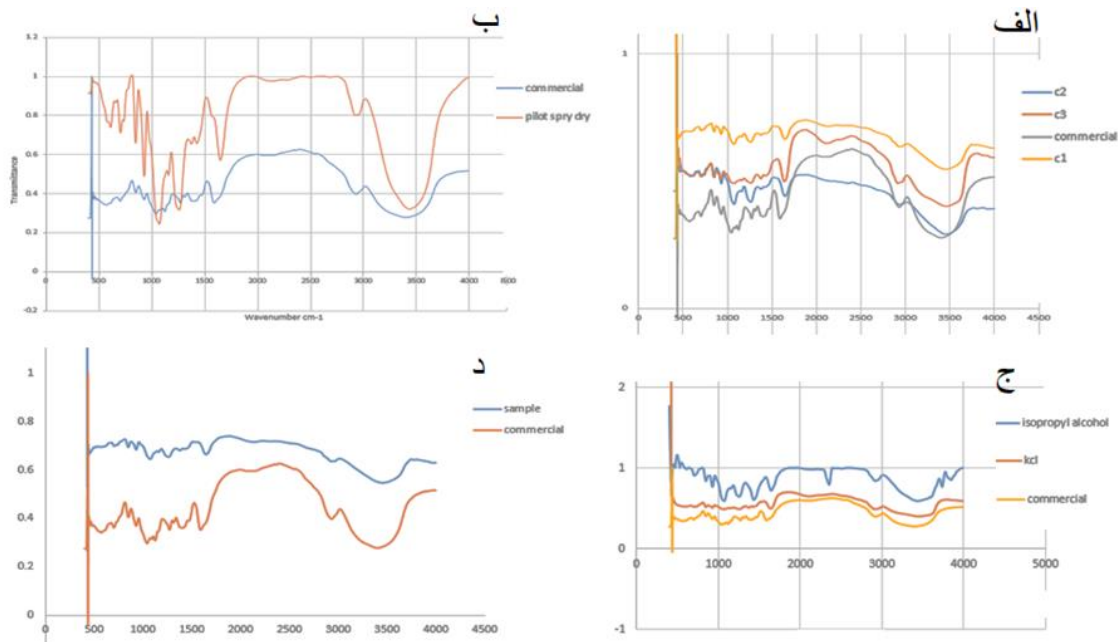
(ب)

(الف)

شکل ۴-۳ مقایسه ساختار کاپا کاراگینان (الف) نمونه تجاری و (ب) ساختار کاپا کاراگینان استخراجی

طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ

نتایج حاصل از طیف FTIR روش‌های مختلف استخراج انجام شده در این پژوهش، در شکل‌های ۳ آورده شده است. بر اساس این نمودارها، استفاده از روش غوطه‌وری در پتاسیم هیدروکساید ۶٪ مطابقت بیشتری با نمونه تجاری دارد. بیشترین جذب کاپا کاراگینان در محدوده ۵۷۸ تا 3600 cm^{-1} وجود دارد. از سوی دیگر، در ناحیه 1210 تا 1260 cm^{-1} (به دلیل S=O سولفات استرها) و منطقه 1010 تا 1080 cm^{-1} (پیوند گلیکوزیدی) جذب بسیار قوی وجود دارد. یک سیگنال شدید در 803 تا 805 cm^{-1} ثبت شده است که مربوط به $3,6$ آنهیدروگالاکتوز ۲ سولفات می‌باشد. سیگنال‌های دیگری در 840 تا 850 cm^{-1} مربوط به دی گالاکتوز ۴ سولفات و همچنین در 925 تا 935 cm^{-1} مربوط به $3,6$ آنهیدرو دی گالاکتوز قابل مشاهده هستند (Webber et al., 2012).



شکل ۵: طیف FTIR نمونه، کاپا کاراگینان استخراج شده (الف) C1 استخراج با پتاسیم کلراید و کلسیم هیدروکساید؛ نمونه C2، استخراج به روش خشک‌کن پاششی؛ نمونه C3، استخراج به روش غوطه‌وری در پتاسیم هیدروکساید ۶٪؛ نمونه Commercial، کاپا کاراگینان تجاری به عنوان نمونه استاندارد. (ب) نمونه کاپا کاراگینان استخراج شده به روش خشک‌کن پاششی در مقیاس پایلوت و نمونه تجاری. (ج) نمونه کاپا کاراگینان استخراج شده با ایزوپروپیل الکل، استخراج شده با پتاسیم کلراید و نمونه تجاری. (د) کاپا کاراگینان استخراج شده و نمونه تجاری.

بحث

در این پژوهش، استخراج کاپا کاراگینان از جلبک قرمز *K. alvarezii* در مقیاس‌های آزمایشگاهی و نیمه-صنعتی صورت پذیرفت. از روش‌های مختلفی شامل استخراج قلیایی با پتاسیم کلراید/کلسیم هیدروکساید، استخراج با پتاسیم کلراید/پتاسیم هیدروکساید، استخراج با ایزوپروپیل الکل و تولید به روش خشک‌کن پاششی استفاده شد. نتایج حاکی از آن بودند که روش استخراج با پتاسیم هیدروکساید ۶٪ علاوه بر بازده استخراج بالا، مشابهت ساختاری بسیار بالایی با نمونه تجاری دارد. مقدار pH

کاراگینان معادل ۸ بود که مطابق با استاندارد بودهمچنین رطوبت کاپا-کاراگینان استخراج شده برابر با ۱۰٪ بود که با توجه به الزامات کیفی حداکثر رطوبت ۱۲٪ گزارش شده است (۳۱). یافته‌ها نشان داده‌اند که گروه‌های سولفات در دی‌ساکارید عامل قلیابیت کاپا کاراگینان هستند (chan et al., 2013). خاکستر کاپا-کاراگینان استخراج شده معادل ۲۸/۵۷٪ بود که در محدوده استاندارد قرار دارد. بر اساس الزامات استاندارد بین‌المللی، مقدار مجاز خاکستر در محدوده ۱۵ تا ۴۰٪ قرار دارد (۳۱). در بررسی مشابه مشخص شد که استخراج با قلیا، خنثی‌سازی، خشک کردن و آسیاب کردن، شستن جلبک خشک شده زیر آب جاری برای دو دقیقه در تولید کاراگینان با خلوص مناسب موثر بوده است (Normah et al., 2003). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که خاکستر نامحلول در اسید در نمونه برابر با ۰/۷۸٪ بود که در محدوده استاندارد (حداکثر ۰/۱٪) بود. سنجش خاکستر نامحلول در اسید عموماً برای تشخیص وجود سنگ، ماسه و ذرات مشابهی که ممکن است به مواد غذایی وارد شود، انجام می‌شود. بررسی ما نشان داد که، استحکام ژل برای کاراگینان مناسب و در حد استاندارد بود. مطالعات نشان می‌دهد نسبت جلبک دریایی به آب و زمان فرآیند بر روی استحکام ژل کاراگینان موثر است و با افزایش این عوامل، استحکام ژل کمتر می‌گردد. همچنین دمای بالاتر استخراج باعث تخریب کاراگینان و یا تولید کاراگینان با استحکام ژل کمتر می‌شود. نتایج مشابه برای جلبک *Gracilaria cliftonii* در پژوهش کومار و فوتدار ارائه شده است (Kumar et al., 2003). هر چه حجم آب بیشتر باشد تورم جلبک دریایی بهتر انجام می‌شود، در نتیجه به کاراگینان اجازه داده می‌شود که به راحتی استخراج گردد. جلبک‌های دریایی خشک شده می‌توانند تا حدود ۲۰ برابر حجم ماده خشک خود متورم شوند. در تحقیق مشابه مشخص شده که غلظت بیشتر پتاسیم کلراید منجر به افزایش بازده، محتوای خاکستر و سولفات و کاهش در استحکام ژل، رطوبت و محتوای خاکستر نامحلول در اسید می‌گردد (Manuhara et al., 2016). در پژوهش حاضر محتوای سولفات کل برای کاپا-کاراگینان استخراج شده، برابر با ۲۵٪ بود و ظرفیت جذب آب برابر با ۶۲٪ اندازه‌گیری شد که در حد استاندارد بود. محتوای سولفات کاراگینان باعث ایجاد نیروی دافعه بین گروه‌های سولفاتی با بار منفی می‌شود، به طوری که زنجیره‌های پلیمری سفت شده و باعث افزایش ویسکوزیته می‌گردد (Manuhara et al., 2016). بالا بودن ظرفیت جذب بدان معناست که به طور میانگین هر گرم از کاپا کاراگینان استخراج شده قادر است ۶۲ گرم آب را به خود جذب کند؛ به عبارت دیگر هر گرم از کاپا کاراگینان استخراجی، آب بیشتری نسبت به نمونه تجاری جذب می‌کند. در بررسی پیشه رو همچنین تعداد کلنی در حد مناسبی بود که نشان دهنده سلامت محصول استخراج شده بود. بر اساس یافته‌های ما مشاهده شد که رنگ، اندازه ذرات، حداقل غلظت ژله‌ای شدن و میزان ویسکوزیته در محدوده استاندارد قرار داشت. گزارش شده است زمانی که محتوای سولفات کمتر باشد، ویسکوزیته کاهش می‌یابد. همچنین در صورت وجود نمک محلول در کاراگینان، بار یونی در طول زنجیره پلیمری کاهش یافته و این شرایط منجر به کاهش دافعه بین گروه‌های سولفات شده که در نهایت باعث ضعیف شدن بخش آب‌دوست پلیمر و کاهش ویسکوزیته می‌گردد. در مقابل، با دفع گروه‌های سولفات دارای بار منفی در امتداد زنجیره پلیمری کاراگینان، ساختار پلیمر سفت و محکم شده و

ویسکوزیته افزایش می‌یابد (۳۱). یافته‌ها نشان داده‌اند که ویسکوزیته ژل با کاهش زمان، دما و غلظت پتاسیم هیدروکساید (w/w) افزایش می‌یابد. در مقابل، استحکام ژل با افزایش متغیرهای یاد شده افزایش پیدا می‌کند. در نهایت شرایط بهینه استخراج با استفاده از پتاسیم هیدروکساید ۱۰٪ برای مدت زمان ۳۰ دقیقه و در دمای ۸۰°C ارزیابی گردید (Bono *et al.*, 2014). در این پژوهش، سینرسیس ژل کاپا کاراگینان به طور قابل توجهی با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت و پس از ۱۰ روز نگهداری به ۱۸/۶۳٪ رسید. ژل کاراگینان قادر است مقدار زیادی آب را در ساختار خود نگه داشته و و از چروک شدن ژل، تغییرات بافتی و کاهش کیفیت مواد غذایی جلوگیری کند. این موضوع به اندازه‌ای دارای اهمیت است که تبدیل به یک چالش در ساخت و فرمولاسیون ژل‌های غذایی شده است (Chan *et al.*, 2013). در تحقیق حاضر بازده به روش غوطه‌وری در پتاسیم هیدروکسید ۶٪ برابر با ۳۴/۸۴٪ ارزیابی گردید. گزارش شده است که زمان و دمای استخراج، تاثیر زیادی در انتقال جرم و بازده استخراج کاراگینان دارد اما افزایش بیشتر زمان و دمای استخراج می‌تواند باعث تخریب پلیمر گردد (۲۴). فائو بازده استخراج کاراگینان را بین ۱۸ تا ۳۵٪ درصد گزارش کرده است (Sormin *et al.*, 2019). بازده استخراج برای کاراگینان نیمه تصفیه شده را در بازه ۳۰٪ تا ۳۹٪ و برای کاراگینان تصفیه شده در بازه ۲۰/۴٪ تا ۲۸/۴٪ گزارش شد که خانواده *K. alvarezii* بیشترین بازده را در تولید کاراگینان داشتند (Ilias *et al.*, 2017). در بررسی حاضر بیشترین جذب کاپا کاراگینان در محدوده ۵۷۸ تا ۳۶۰۰ cm⁻¹ وجود داشت. از سوی دیگر، در ناحیه ۱۲۱۰ تا ۱۲۶۰ cm⁻¹ و منطقه ۱۰۱۰ تا ۱۰۸۰ cm⁻¹ جذب بسیار قوی وجود داشت. یک سیگنال شدید در ۸۰۳ تا ۸۰۵ cm⁻¹ ثبت شده است که مربوط به ۳،۶ انهیدروگالاکتوز ۲ سولفات بود. براساس این اساس، بالاترین میزان مشابهت مابین انواع نمونه‌های کاپا کاراگینان استخراج شده در این پژوهش با نمونه تجاری، در روش استخراج با پتاسیم هیدروکساید ۶٪ مشاهده گردید و بازده استخراج در این روش برابر با ۳۴/۸۴٪ به دست آمد. در پژوهش حاضر به مدت زمان پیش تصفیه و مدت زمان استخراج و دمای استخراج در همه مراحل توجه شد تا در حد مناسبی باشد. یافته‌ها نشان داده‌اند که افزایش مدت زمان پیش تصفیه منجر به کمتر شدن تعداد گروه‌های سولفاتی و مونومرهای پیش‌ساز بیولوژیکی گردید. همچنین با افزایش این مدت زمان، ویژگی‌های ژل شوندگی در حضور پتاسیم کلراید بهبود یافتند. افزایش مدت زمان استخراج، بدون اینکه تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی ساختار شیمیایی پیچیده کاراگینان ترکیبی داشته باشد، بازده آن را بهتر کرد (Hilliou *et al.*, 2006). طی بررسی دیگر دماهای ۶۰°C تا ۸۰°C برای این استخراج مناسب بودند. در دمای ۸۰°C با استفاده از محلول پتاسیم هیدروکساید ۱/۰ M کاراگینان تشکیل شده بالاترین میزان خلوص از نظر ۳،۶ انهیدروگالاکتوز، غلظت پایین‌تر فلزات سنگین و بالاترین نیروی گسیختگی^۶ و نیروی شکست^۷ را نشان داد (Mustapha *et al.*, 2011). بر اساس مطالعه‌ای بیان شده که بهترین شرایط انجام فرآیند مربوط به نسبت جلبک به آب برابر با ۱ به ۲۵،

⁶ Rupture Force

⁷ Fracture Force

دما برابر $85/80^{\circ}\text{C}$ و زمان انجام فرآیند برابر با ۴ ساعت بود. تحت این شرایط بهینه، بازدهی به میزان ۳۱٪ و استحکام ژل حاصل برابر با 1833 g/cm^2 به دست آمد (Nurimah et al., 2017). در بررسی حاضر به زمان، دما و نمک در مراحل استخراج توجه شد یافته‌های گذشته تاثیر این ترکیبات را بر بازده استخراج گزارش داده اند (Manuhara et al., 2023; Yang et al., 2020). در یک بررسی مشابه، اثر حلال‌های مختلف (پتاسیم هیدروکساید و سدیم هیدروکساید) و روش‌های مختلف خشک کردن را بر خواص فیزیکی (ویسکوزیته، مورفولوژی سطح و گروه عاملی) کاراگینان تصفیه شده از *K. alvarezii* مورد مطالعه قرار دادند. مطابق نتایج این پژوهش، بازده کاراگینان استخراج شده توسط پتاسیم هیدروکساید و سدیم هیدروکساید و خشک کردن با آون، به ترتیب برابر با ۱۲٪ و ۱۸٪ بود. با ترتیب مشابه، بازده کاراگینان خشک شده توسط خشک‌کن انجمادی برابر با ۱۰٪ و ۱۲٪ به دست آمد. از نظر مورفولوژی سطح، کاراگینان استخراج شده توسط پتاسیم هیدروکساید و خشک شده توسط آون، سطح صافی را در مقایسه با سایر نمونه‌ها از خود نشان داد. غلظت سولفات برای کاراگینان استخراج شده توسط پتاسیم هیدروکساید و سدیم هیدروکساید و خشک شده توسط آون، به ترتیب برابر با 22 mg/L و 69 mg/L به دست آمد. همین نتایج برای خشک‌کن انجمادی به ترتیب برابر با 33 mg/L و 44 mg/L بود. ویسکوزیته کاراگینان با خشک‌کن آون برابر با ۳۴ و ۴۹ cP و برای خشک‌کن انجمادی برابر با ۳۳ و ۴۷/۴ cP به دست آمد (Awalludin et al., 2021). عوامل تاثیرگذار همچون دما، زمان اجرایی (سرعت) استخراج، غلظت قلیا، قدرت یونی محیط قلیایی و نسبت جلبک به آب بر می‌تواند بر اجزای کاراگینان استخراج شده تاثیر بگذارند (Basmal et al., 2005). در بررسی حاضر استفاده از مایعات یونی عملکرد بهتری در استخراج نشان داد. مایعات یونی علاوه بر سازگاری بیشتر با محیط زیست، به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ممتازی مانند توانایی حل کردن محدوده وسیعی از ترکیبات آلی و معدنی، فشار بخار ناچیز، دمای جوش بالا، قابلیت بازیافت و ثبات شیمیایی و حرارتی بالا، جایگزین‌های شاخصی برای حلال‌های آلی به شمار می‌آیند (Kassaye et al., 2017). Muliani et al (2021) همبستگی متوسطی بین پارامترهای فیزیکی و شیمیایی در محل آزمایش و ویسکوزیته کاراگینان استخراج شده از جلبک دریایی *K. alvarezii* در آب‌های خلیج‌های مختلف اندونزی پیدا کرد. نتایج نشان داد که ویسکوزیته کاراگینان زمانی که نهال‌ها در آب‌های نسبتاً کم عمق در فواصل ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری کاشته می‌شدند بسیار بالاتر بود (Mulyani et al., 2021). البته تلاش‌های اخیر برای کاهش استفاده از مواد شیمیایی منجر به توسعه حلال‌ها و رویکردهای سازگار با محیط زیست شده است که از حلال کمتری استفاده می‌کنند و به انرژی و زمان استخراج کمتری نسبت به روش‌های سنتی نیاز دارند (Torres et al., 2021; Martín-Del-Campo et al., 2021). از جمله امواج میکروویو که به دلیل صرفه‌جویی در زمان، انرژی و حلال، به عنوان یک تکنیک استخراج دوست‌دار محیط زیست شناخته شده است (Martín-Del-Campo et al., 2021; Kapoor et al., 2018). استفاده از روش‌های تلفیقی در کنار روش‌های رایج می‌تواند در بازدهی استخراج موثر باشد.

نتیجه‌گیری

استخراج با پتاسیم هیدروکساید ۶٪ علاوه بر بازده استخراج بالا، مشابهت ساختاری بسیار بالایی با نمونه تجاری دارد. از سوی دیگر، کلیه ویژگی‌های کمی و کیفی ارزیابی شده کاپا کاراگینان استخراج شده شامل رنگ، pH، رطوبت، خاکستر کل، خاکستر نامحلول در اسید، محتوای سولفات، ظرفیت جذب آب، حداقل غلظت زله‌ای شدن، استحکام ژل، سینرسیس، ویسکوزیته، بازده، شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، مورفولوژی و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ، تطابق کاملی با استانداردهای مربوطه داشته و لذا کاربرد آن را در فرآورده‌های غذایی تضمین نمود. پیشنهاد می‌شود در آینده از جلبک‌های بومی ایران و روش‌های نوین در استخراج همچون ماکروویو برای استخرا بهینه کاراگینان استفاده شود.

منابع

- A. Awalludin, N. Mingu, A. Z. Yaser, H. Mamat, K. A. Kamaruzaman, Z. Jamain, Md. L. Rahman, M. H. A. Majid, and M. S. Sarjadi**, "Extraction and Physicochemical Properties of Refined Kappa-Carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* Originated from Semporna, Sabah," *Journal of Applied Science and Engineering*, Vol. 25, No. 3, P. 411-416, 2021.
- A. Bianchi, V. Sanz, H. Dominguez, and M. D. Torres**, "Valorisation of the industrial hybrid carrageenan extraction wastes using eco-friendly treatments," *Food Hydrocolloids*, vol. 122, p. 107070, 2022.
- A. Bono, Y. Y. Farm, S. M. Yasir, B. Arifin, and M. N. Jasni**, "Production of Fresh Seaweed Powder using Spray Drying Technique," *Journal of Applied Sciences*, vol. 11, no. 13, p. 2340-2345, 2011
- A. Diharmi, A. Rusnawati, and N. Irasari**, "Characteristic of carrageenan *Eucheuma cottonii* collected from the coast of Tanjung Medang Village and Jaga Island, Riau," *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020
- A. Ellis, and J. C. Jacquier**, "Manufacture of food grade k-carrageenan microspheres," *Journal of Food Engineering*, vol. 94, p. 316-320, 2009.
- A. K. Das, R. A. Sequeira, T. K. Maity, and K. Prasad**, "Bio-ionic liquid promoted selective coagulation of κ -carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* extract," *Food Hydrocolloids*, vol. 111, p. 106382, 2021.
- Bono, S. M. Anisuzzaman, and O. Wan Ding**, "Effect of process conditions on the gel viscosity and gel strength of semi-refined carrageenan (SRC) produced from seaweed (*Kappaphycus alvarezii*)," *Journal of King Saud University – Engineering Sciences*, vol. 26, p. 3–9, 2014.
- D. Yang, and H. Yang**, "The temperature dependent extraction of polysaccharides from *eucheuma* and the rheological synergistic effect in their mixtures with kappa carrageenan," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 129, p. 109515, 2020.
- G. Hernandez-Carmona, Y. Freile-Pelegrin, and E. Hernandez-Garibay**, "Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals," Woodhead Publishing, 2013.
- G. J. Manuhara, D. Praseptianga, and R. A. Riyanto**, "Extraction and characterization of refined K-carrageenan of red algae [*Kappaphycus alvarezii* (Doty ex P.C. Silva, 1996)] originated from Karimun Jawa Islands," *Aquatic Procedia*, vol. 7, p. 106-11, 2016.
- G. J. Manuhara, D. Praseptianga, and R. A. Riyanto**, "Extraction and characterization of refined

K-carrageenan of red algae [*Kappaphycus alvarezii* (Doty ex P.C. Silva, 1996)] originated from Karimun Jawa Islands,” *Aquatic Procedia*, vol. 7, p. 106-11, 2016.

H. J. Bixler, and H. Porse, “A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry,” *Journal of Applied Physics*, vol. 23, p. 321–335, 2011.

Iran National Standards Organization, “Permitted food additives – Carrageenan - Test methods” 19033, 1st revision, 2022.

J. Basmal, D. Suryaningrum, and Y. Yeni, “Pengaruh konsentrasi larutan potasium hidroksida terhadap karagenan kertas,” *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, vol. 11, no. 8, p. 1-9, 2005.

J. Cai, N. Hishamunda, and N. Ridler, “Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming: a global synthesis,” *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 2013.

J. Necas, and L. Bartosikova, “Carrageenan: a review,” *Veterinarni Medicina*, vol. 58, no. 4, p. 187–205, 2013.

J. S. Lee, Y. L. Lo, and F. Y. Chye, “Effect of K(+), Ca(2+) and Na(+) on gelling properties of *Eucheuma cottonii*,” *Sains Malaysiana*, vol. 37, no. 1, p. 71-77, 2008.

L. Hilliou, F. D. S. Larotonda, P. Abreu, A. M. Ramos, A. M. Sereno, and M. P. Goncalves, “Effect of extraction parameters on the chemical structure and gel properties of κ/ι - hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus*,” *Biomolecular Engineering*, vol. 23, p. 201-208, 2006.

L. Wen, Z. Zhang, D-W. Sun, S. P. Sivagnanam, and B. K. Tiwari, “Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 60, no. 11, p.1826–1841, 2020.

Lerisa Firdayanti, Rini Yanti, Endang Sutriswati Rahayu, Chusnul Hidayat, Carrageenan extraction from red seaweed (*Kappaphycopsis cottonii*) using the bead mill method, *Algal Research*.2023,69, 102906.

M. A. Ilias, A. Ismail, and R. Othman, “Analysis of carrageenan yield and gel strength of *Kappaphycus* species in Semporna Sabah,” *Journal of Tropical Plant Physiology*, vol. 9, p. 14-23, 2017.

M. Jum’at, N. Cokrowati, & S. Y. Lumbessy. Cultivation of Seaweed *Kappaphycus alvarezii* with Various Substrates Different on Laboratory Scale. *Journal of Coastal and Ocean Sciences*, 5(1), 53-61.2024.

M. Mangione, D. Giacomazza, D. Bulone, V. Martorana, and P. L. San Biagio, “Thermoreversible gelation of κ -Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation,” *Biophysical Chemistry*, vol. 104, p. 95–105, 2003.

M.M. Hossain, F. Sultana, S. Khan, et al. Carrageenans as biostimulants and bio-elicitors: plant growth and defense responses. *Stress Biology* 4, 3 .2024.

Martín-Del-Campo A, Fermín-Jiménez JA, Fernández-Escamilla VV, Escalante-García ZY, Macías-Rodríguez ME, Estrada-Girón Y. Improved extraction of carrageenan from red seaweed (*Chondracantus canaliculatus*) using ultrasound-assisted methods and evaluation of the yield, physicochemical properties and functional groups. *Food Sci Biotechnol*. 2021 Jul 6;30(7):901-910.

Mulyani, S., Tuwo, A., Syamsuddin, R., Jompa, J., and Cahyono, I. (2021). Relationship of the viscosity of carrageenan extracted from *Kappaphycus alvarezii* with seawater physical and chemical properties at different planting distances and depth. *AACL Bioflux* 14, 328–336.

N. Stanley, “FAO Corporate document repository, Chapter 3: Production, properties and uses of carrageenan,” *FMC Corporation*, 2011.

Nurani, W., Anwar, Y., Batubara, I., Arung, E. T., & Fatriasari, W. (2024). *Kappaphycus alvarezii* as a renewable source of kappa-carrageenan and other cosmetic ingredients. *International journal of biological macromolecules*, 260(Pt 1), 129458.

O. Normah, and I. Nazarifah, “Production of semi-refined carrageenan from locally available red seaweed, *Eucheuma cottonii* on a laboratory scale,” *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*,

vol. 31, no. 2, p. 207-213, 2003.

P. Imeson, G. O. Phillips, and P. A. Williams, "Carrageenan and furcellaran. In: Handbook of hydrocolloids, Second edition," Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2009.

R. B. D. Sormin, A. Masela, and Idris, "Physicochemical properties of carrageenan originated from Lermatang Village, Southwest Maluku District," *The 1st Maluku International Conference on Marine Science and Technology. Series: Earth and Environmental Science*, 2019.

R. L. Montolulu, Y. Tasyiro, S. Matsukawa, and H. Ogawa, "Effects extraction parameters on gel properties of carrageenan from *K. alvarezii* (Rhodophyta)," *Journal of Applied Phycology*, vol. 20, p. 521-526, 2008.

R. V. Kapoore, T. O. Butler, J. Pandhal, and S. Vaidyanathan, "Microwave-assisted extraction for microalgae: From biofuels to biorefinery," *Biology*, vol. 7, p.1-25, 2018.

S. Hotchkiss, M. Brooks, R. Campbell, K. Philp, and A. Trius, "The use of carrageenan in food Sources and extraction methods, molecular structure, bioactive properties and Health effects," Nova Science Publishers, p. 229-243, 2016.

S. Kassaye, K. K. Pant, and S. Jain, "Hydrolysis of cellulosic bamboo biomass into reducing sugars via a combined alkaline solution and ionic liquid pretreatment steps," *Renewable Energy*, vol. 104, p. 177-184, 2017.

S. Keppeler, A. Ellisa, and J. C. Jacquier, "Cross-linked carrageenan beads for controlled release delivery systems," *Carbohydrate Polymers*, vol. 78, p. 973-977, 2009.

S. Mustapha, H. Chandar, Z. Z. Abidin, R. Saghraani, and M.Y. Harun, "Production of semi refined carrageenan from *Eucheuma cottonii*," *Journal of Scientific & Industrial Research*, vol. 70, p. 865-870, 2011.

S. Nurimah, R. Syarief, N. Sukarno, R. Peranginangin, B. Nurtama, and I. Jaswir, "Production of refined carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* on pilot plant scale: optimization of water extraction using Response Surface Methodology," *International Food Research Journal*, vol. 24, p. 522-528, 2017.

S. W. Chan, H. Mirhosseini, F. S. Taip, T. C. Ling, and C. P. Tan, "Comparative study on the physicochemical properties of k-carrageenan extracted from *Kappaphycus alvarezii* (doty) doty ex Silva in Tawau, Sabah, Malaysia and commercial k-carrageenans," *Food Hydrocolloids*, vol. 30, p. 581-588, 2013.

T. Barbeyron, G. Michel, P. Potin, B. Henrissat, and B. Kloareg, "ι-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of κ-carrageenases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, p. 35499-35505, 2000.

Torres, M. D., Flórez-Fernández, N., and Dominguez, H. (2021). Ultrasound-assisted water extraction of *Mastocarpus stellatus* carrageenan with adequate mechanical and antiproliferative properties. *Mar. Drugs* 19:280. doi: 10.3390/md19050280

V. Kumar, and R. Fotedar, "Agar extraction process for *Garcilaria cliftonii*," *Carbohydrate Polymers*, vol. 78, no. 4, p. 813-819. 2009.

V. L. Campo, D. F. Kawano, D. B. da Silva Jr, and I. Carvalho, "Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review," *Carbohydrate polymers*, vol. 77, no. 2, p. 167-180, 2009.

V. Webber, S. M. de Carvalho, P. J. Ogliari, L. Hayashi, and P. L. M. Barreto, "Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology," *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 32, no. 4, p. 812-818, 2012.