استخراج پلی‌ساکارید محلول در آب از قارچ خوراکی صدفی به‌کمک امواج فراصوت و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن

حسین جوینده[1*]، زهرا حاجی‌ابراهیمی فروشانی[2]

۱- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی
۲- کارشناس ارشد صنایع غذایی

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۳)

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر امواج فراصوت در توان‌های ۸۰-۴۰ درصد (معادل ۲۳۲-۴۶۴ وات)، دماهای استخراج ۸۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های استخراج ۳۰-۱۰ دقیقه بر میزان راندمان استخراج پلی‌ساکارید محلول در آب از قارچ خوراکی صدفی (*Pleurotus ostreatus*) انجام پذیرفت. بهینه‌یابی فرایند استخراج و بررسی تأثیر اثرات اصلی و متقابل فاکتورها با استفاده از روش سطح پاسخ و به کمک طرح Box–Behnken با سه متغیر و در سه سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی انجام شد. همچنین پلی‌ساکارید استخراج شده از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال OH و DPPH) مورد بررسی قرار گرفت. بهینه‌سازی بازده استخراج پلی‌ساکارید به کمک روش سطح پاسخ نشان داد که ترکیبی از توان امواج فراصوت ۵۸/۰۶ درصد (معادل ۳۳۷ وات)، دمای استخراج ۶۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد و زمان امواج‌دهی ۲۱/۷۲ دقیقه باعث بیشترین بازده (۱۷/۷۱ درصد) استخراج گردید. نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که هرچند پلی‌ساکارید استخراجی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اسید آسکوربیک و سنتزی BHT از قابلیت کمتری در جذب رادیکال‌های آزاد برخوردار بود اما خواص ضداکسایشی قابل قبولی از خود نشان داد.

کلید واژگان: بهینه‌یابی، قارچ صدفی، روش سطح پاسخ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

* نویسنده مسئول: hosjooy@asnrukh.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

۱- مقدمه

باتوجه به گرایش روز افزون بشر به درمان توسط مواد طبیعی، قارچ‌ها می‌توانند منبعی مناسب برای تأمین این نیاز باشند. مؤثر و ارزان بودن و سهولت استفاده (تهیه و مصرف) قارچ‌ها از مهمترین مزایای آن‌ها به‌عنوان ترکیبات فراسودمند است. خاصیت درمانی قارچ‌های ماکروسکوپی تا سال‌های اخیر در پرده‌ای از ابهام باقی مانده بود تا اینکه بررسی‌های علمی، خواص دارویی و تغذیه‌ای آن‌ها را نشان داد. از جمله این خواص می‌توان به خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی، ضدحساسیت، تقویت سیستم ایمنی، ضدتوموری، کاهش قند و فشار خون اشاره کرد [۱].

پلی‌ساکاریدها از جمله ترکیبات مهم و مفید در قارچ‌ها هستند و دارای ویژگی‌های تغذیه‌ای مناسبی مانند ضدسرطان، جاذب رادیکال‌های آزاد، افزایش تولید هیدروکسی پرولین و گلیکوزآمینوگلیکان (مؤثر در درمان بیماری‌های مفاصل) می‌باشند [۲]. تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع پلی ساکارید از اسپور، میسلیوم و محیط کشت مایع قارچ‌ها جدا شده است. از این پلی‌ساکاریدها می‌توان به بتا دی-گلوکان‌ها، هتروپلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها اشاره کرد. پلی‌ساکاریدهای کیتین و کیتوزان که در دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شوند دارای خواص دارویی هستند؛ به‌طوری که در تنظیم عمل کبد، روده و کلیه سهم بسزایی دارند [۳]. تحقیقات نشان داده است که پروتئین‌های متصل به پلی‌ساکاریدهایی که از قارچ خوراکی استخراج شده است، دارای فعالیت ضدتومور و ضد دیابت هستند [٤]. همچنین پلی‌ساکاریدهای قارچ *Ganoderma lucidum* باعث کاهش قند خون در موش‌های آزمایشگاهی به‌وسیله آزاد ساختن انسولین از سلولهای β-پانکراس می‌شود [٥]. تحقیقات اولیه که توسط هیکینو و همکاران [٦] در سال ۱۹۸۵ انجام گرفت نشان داد که پلی‌ساکاریدهای موجود در این قارچ باعث کاهش قند خون می‌شوند.

یکی از تغییرات عمده‌ای که در حین فراوری، توزیع، انبارداری و آماده‌سازی مواد غذایی روی می‌دهد، اکسیداسیون روغن‌ها و چربی‌ها است. این رویداد نه‌تنها باعث از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای می‌شود، بلکه محصولات اکسیدشده‌ای مانند رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند که منجر به واکنش‌های متعدد نامطلوب شیمیایی می‌گردد. به‌علاوه، هرچند در متابولیسم بسیاری از ارگانیسم‌ها، اکسیداسیون یکی از مهمترین فرایندها برای تأمین انرژی است، اما برخی از اکسیداسیون‌های غیرکنترل شده منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS[1]) می‌شود که برای سلامتی بدن مضر هستند. این گونه‌های فعال اکسیژن که غالباً شامل آنیون‌های سوپراکساید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشند [۷] به دلیل الکترون‌های تنها و نامتعادل خود بسیار ناپایدار هستند و ممکن است باعث ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در بدن شوند. این آسیب‌ها ممکن است به صورت بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت و سرطان بروز نماید [۸]. یکی از روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات، سنجش قدرت آن‌ها در مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل می‌باشد. رادیکال‌های هیدروکسیل به‌عنوان فعال‌ترین رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شوند که می‌توانند از تمام غشاهای سلولی به‌راحتی عبور نموده و با ترکیبات داخل سلولی مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA وارد واکنش شوند و منجر به آسیب بافتی و یا مرگ سلولی شوند [۹]. بنابراین مهار رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل برای دفاع آنتی‌اکسیدانی در سلول‌ها یا سیستم‌های غذایی بسیار مهم است. همچنین، بررسی فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. رادیکال DPPH یک رادیکال لیپوفیل است که دارای جذب بیشینه در طول موج ۵۱۷ نانومتر است. در این روش رنگ ارغوانی رادیکال های DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر، توسط آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش یافته و به رنگ زرد

1. Reactive oxygen species

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

تبدیل می‌شود. درجه بی‌رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان مربوطه می‌باشد [۱۰].

تاکنون تحقیقات محدودی در زمینه استخراج پلی‌ساکارید از انواع قارچ و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن انجام شده است. Kan و همکاران [۱۱] با بررسی تأثیر عوامل مؤثر در استخراج پلی‌ساکارید حاصل از قارچ جان‌افزا (*Ganoderma lucidum*)، بهترین شرایط استخراج جهت بالاترین راندمان پلی‌ساکارید (۲/٤٤ درصد) را زمان ۱۳۷ دقیقه، نسبت آب به مواد ۳۵ میلی‌لیتر بر گرم و دمای ٦٦ درجه سانتی‌گراد تعیین نمودند. این محققین خاصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده با کمک اتانول ۸۰ درصد را بسیار بالاتر از سایر غلظت‌ها (٤۰ و ٦۰ درصد اتانول) گزارش نمودند. Zhang و همکاران [۱۲] از امواج فراصوت جهت استخراج پلی‌ساکارید از قارچ شاه صدف (*Pleurotus eryngii*) استفاده نمودند. این محققین استفاده از توان ۵۱۷ وات، نسبت آب به مواد ۱۹ میلی‌لیتر بر گرم و زمان ۳۹ دقیقه را به‌عنوان بهترین شرایط جهت استخراج پلی‌ساکارید (راندمان ۳٤/۳ درصد) تعیین نمودند. در این تحقیق نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده با کمک اتانول ۸۰ درصد بسیار بالاتر از سایر غلظت‌ها (۳۰ و ٦۰ درصد اتانول) مشخص شد. Zou و همکاران [۱۳] بهترین شرایط استخراج پلی‌ساکارید از قارچ گوش ژله‌ای (*Auricularia auricula*) را نسبت آب به مواد ۳۸/۷۷ میلی‌لیتر بر گرم، دمای ۹۳/۹۸ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳/٤۱ ساعت گزارش نمودند. در این شرایط میزان راندمان استخراج پلی‌ساکارید ۱۰/٤٦ درصد تعیین گردید و توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل توسط آن در غلظت-های مشابه بالاتر از آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT بود. در تحقیقی دیگر، استخراج پلی‌ساکارید از میسیلیوم قارچ *Monascus* توسط آب داغ با شرایط قلیایی مقایسه گردید و میزان راندمان در حالت قلیایی (۱۰/۱ درصد) بسیار بالاتر از استخراج با آب داغ (٤/۷٦ درصد) تعیین شد [١٤]. دمای ٤۹ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲/۳ ساعت، شرایط قلیایی ۷ درصد و نسبت آب به مواد ۲۳ میلی‌لیتر بر گرم به عنوان شرایط بهینه استخراج گزارش گردید. همچنین در این تحقیق اختلافی از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی (جذب رادیکال سوپراکساید و مهار رادیکال DPPH) میان پلی‌ساکارید استخراج شده در شرایط قلیایی با شرایط آب داغ مشخص نگردید.

قارچ خوراکی صدفی یا پلوروتوس (*Pleurotus ostreatus*)، در میان سایر قارچ‌های خوراکی دومین بازار تولید و مصرف را در دنیا به خود اختصاص داده است. این نوع قارچ‌ها علاوه بر ظاهر زیبا و عطر و طعم دلپذیر، منبع غذایی ارزشمندی برای انسان به‌حساب می آیند و انواع مختلفی از گونه‌های آن در جهان شناخته شده است [۱۵]. گونه‌های مختلف جنس پلوروتوس از جمله قارچ‌های تجزیه کننده‌ای است که مستقیما روی بسترهای کشت قادر به رشد بوده و نیازی به عملیات تخمیر اولیه یا کمپوست‌سازی برای کشت آن نمی‌باشد [١٦]. ویژگی‌های منحصربه فرد تولید این قارچ نظیر سادگی روش تولید، سرعت بالای رشد، مقاومت در برابر بیماری‌ها و آفات، امکان استفاده از ضایعات کشاورزی و صنعت غذا در تولید آن [۱۷] و همچنین خواص جالب توجه غذایی و دارویی آن همانند تأمین مواد مغذی مورد نیاز بدن شامل پروتئین، فیبر، املاح و ویتامین‌ها و تأثیر مفید بر سلامتی انسان بویژه جلوگیری از سرطان کولون و سینه [۱۸]، کاهش کلسترول خون، آنتی‌آتروژنیک (ضد بیماری‌های قلبی-عروقی) [۱۹]، خواص آنتی‌اکسیدانی [۲۰] و ضدمیکروبی [۲۱] و بسیاری از مزایای دیگر سبب شده است که تولید آن به عنوان محصولی ارزشمند مورد توجه بسیاری از محققین قرار گیرد. امروزه پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی به دلیل خواص تغذیه‌ای و درمانی، با قیمت بسیار بالایی در بازارهای جهانی به فروش می‌رسد. این درحالی است که اطلاعات و مستندات کافی در خصوص استخراج پلی‌ساکارید

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

از قارچ خوراکی صدفی، به‌ویژه نحوه تأثیر امواج فراصوت بر فرایند استخراج وجود ندارد. بنابراین، این پژوهش به منظور بررسی تأثیر شرایط مختلف تیمار فراصوت بر میزان استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی انجام پذیرفت. از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه‌ی فاکتورهای مورد بررسی استفاده شد زیرا در این روش جهت حصول حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمون، تیمارهای کمتر و همچنین زمان کمتری مورد نیاز است. به‌علاوه، در این پژوهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی یا ویژگی جذب رادیکال‌های آزاد توسط پلی‌ساکارید استخراج شده به روش‌های مختلف بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مصرفی

قارچ خوراکی صدفی (شرکت قارچ آرین، کرج) از بازار خریداری گردید. قارچ‌ها به منظور جداسازی تمامی ناخالصی-ها و مواد خارجی به‌صورت دستی تمیز گردیدند و سپس با آب به خوبی شسته شدند. سپس با آب مقطر آبکشی شدند و در آون تحت خلا در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل یک شبانه روز قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. اتانول از شرکت رازی تهیه گردید و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی صدفی

استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی به کمک روش مزارعی و همکاران [۲۲] انجام گرفت. به طور خلاصه، ۲۰۰ گرم قارچ خشک شده در یک مخلوط کن خرد شد و به پودر نرمی تبدیل شد. سپس جهت غیرفعال کردن آنزیم‌های قارچ و همچنین حذف مواد رنگی، چربی و الیگوساکاریدها، پودر قارچ ۳ بار با اتانول ۶۰ درصد با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت مخلوط و شستشو شد. پس از شستشو، ترکیبات قارچ به کمک سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از مخلوط الکلی جداسازی و در نهایت در آون تحت خلاء خشک شد. فرایند استخراج با کمک دستگاه حمام فراصوت (Elmasonic، مدل P60H، Germany) قابل تنظیم تا حداکثر توان ۵۸۰ وات (معادل ۱۰۰ درصد) و در فرکانس ۶۰ هرتز انجام پذیرفت. در این تحقیق فرآیند استخراج پلی‌ساکارید از ۲۰ گرم نمونه خشک شده قارچ با آب داغ (به نسبت ثابت ۱ به ۱۵) و در توان‌های مختلف امواج فراصوت (۴۰ تا ۸۰ درصد)، دماهای مختلف (۵۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های مختلف استخراج (۱۰ تا ۳۰ دقیقه) با توجه به آزمون‌های مقدماتی انجام پذیرفت. از اتانول ۸۰ درصد جهت تکمیل فرآیند استخراج و رسوب‌دهی پلی-ساکارید حاصل استفاده شد. پلی‌ساکارید رسوب کرده در آون تحت خلا به کمک هوای گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و توزین گردید و بازده استحصال پلی‌ساکارید به کمک رابطه زیر تعیین گردید:

$$\text{راندمان استخراج}\ (\%) = \frac{\text{وزن پلی‌ساکارید حاصل}}{\text{وزن قارچ خشک اولیه}} \times 100$$

معادله ۱

۲-۲-۲- بررسی خصوصیت آنتی‌اکسیدان پلی‌ساکارید استخراج شده

۲-۲-۲-۱- سنجش قدرت پلی‌ساکارید در مهار رادیکال هیدروکسیل (OH)

توانایی و قابلیت جذب رادیکال‌های هیدروکسیل توسط پلی‌ساکارید استخراج شده به کمک روش ارائه شده توسط ژونگ و همکاران ارزیابی شد [۲۳]. نمونه پلی‌ساکاریدها در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در غلظت‌های متفاوت ۵۰ تا ppm ۳۰۰ حل شدند. محلول نمونه با ۱ میلی‌لیتر سولفات آهن (۱/۵ مول) و ۰/۳ میلی‌لیتر سدیم سالیسیلات (۲۰ مولار) مخلوط و سپس محلول حاصل با ۰/۷ میلی‌لیتر از H_2O_2 (۶ مولار)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

مخلوط شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ماکزیمم جذب در ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط مشابهی حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و فاقد پلی‌ساکارید به‌عنوان نمونه شاهد تهیه شد. درصد مهار رادیکال هیدروکسیل به کمک رابطه زیر تعیین گردید:

$$\text{توانایی جذب رادیکال‌های } OH\ (\%) = 1 - \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

معادله ۲

A_0: میزان جذب مخلوط بدون پلی ساکارید در طول ۵۶۲ نانومتر

A_1: میزان جذب مخلوط حاوی پلی ساکارید در طول ۵۶۲ نانومتر

۲-۲-۲-۲- سنجش قدرت پلی‌ساکارید در مهار رادیکال DPPH

ارزیابی خاصیت جذب رادیکال آزاد پلی‌ساکارید استخراج شده با استفاده از روش بلیوس [۲٤] با کمی تغییرات انجام گرفت. پس از آماده‌سازی محلول DPPH (۰/۱ میلی مول در متانول)، ۱ میلی‌لیتر از این محلول به مقدار ۳ میلی‌لیتر از محلول متانولی حاوی غلظت‌های مختلف پلی‌ساکارید (۵۰ تا ۳۰۰ ppm) اضافه شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، میزان جذب مخلوط در ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری (مدل Genesys، ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد. مخلوطی مشابه حاوی اسید آسکوربیک به عنوان نمونه شاهد تهیه گردید. میزان جذب کمتر مخلوط واکنش، نشان دهنده فعالیت بیشتر جذب رادیکال‌های آزاد می باشد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید:

$$DPPH\ (\%) = 1 - \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

معادله ۳

A_0: میزان جذب مخلوط بدون پلی ساکارید در طول ۵۱۷ نانومتر

A_1: میزان جذب مخلوط حاوی پلی ساکارید در طول ۵۱۷ نانومتر

۲-۳- طرح آزمایش‌ها و تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی شرایط مناسب استخراج پلی‌ساکارید (زمان استخراج، دمای استخراج و توان فراصوت)، با انجام آزمایش-های مقدماتی، محدوده متغیرها با توجه به اهداف مورد نظر یعنی بیشینه نمودن میزان استخراج تعیین گردید. به‌منظور بهینه‌سازی فرایند استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی (*Pleurotus ostreatus*) ، از طرح باکس بنکن (*BBD*) استفاده شد. در این تحقیق سه متغیر مستقل شامل میزان توان امواج فراصوت (x_1، در محدوده۸۰-٤۰ درصد)، زمان استخراج (x_2، در محدوده ۳۰-۱۰ دقیقه) و دمای استخراج (x_3، در محدوده ۸۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد) هر کدام در سه سطح در نظر گرفته شد (جدول ۱). پس از انجام آزمون‌های پیشنهادی مطابق نرم افزار دیزاین اکسپرت[1] نسخه ۱۱ (جدول ۲)، مدل‌سازی براساس نتایج آزمون‌های اصلی صورت پذیرفت و شکل‌های سه بعدی جهت بررسی روند تغییرات رسم شدند.

در روش سطح پاسخ برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و اثرات متقابل احتمالی بین فاکتورها را بر هر ویژگی مورد مطالعه جداگانه بررسی می‌کند. مدل مورد استفاده در این تحقیق رابطه درجه دوم می‌باشد که به صورت زیر نمایش داده می‌شود.

معادله ٤

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2$$

در این معادله Y ویژگی مورد مطالعه، β_0 ثابت مدل، β_1 ، β_2 و β_3 ضرایب خطی، X_i و X_j متغیرهای مستقل در شکل کد شده، β_{12} ، β_{13} و β_{23} اثر متقابل متغیرها و β_{11} ، β_{22} و β_{33} ضریب درجه دوم متغیرهای مستقل می‌باشد[۲۲]. جدول ۱ متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها را نشان می‌دهد.

1. Design Expert

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

Table 1 Coded and uncoded levels of independent variables according to the CCD

Indipendent variables	Symbol	Coded levels		
		-1	0	+1
Extraction ultrasounic power (%)	X_1	40	60	80
Extraction temperature (°C)	X_3	50	65	80
Extraction time (min)	X_2	10	20	30

Table 2 Experimented and predicted yield values of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* obtained from BBD design

Sample No.	Extraction power (%)	Extraction temperature (°C)	Extraction time (°C)	Experimented values	Predicted values
1	40	50	20	14.87	14.93
2	40	65	30	15.91	16.08
3	40	80	20	15.18	15.12
4	40	65	10	15.28	15.19
5	60	80	30	16.11	16.11
6	60	65	20	17.46	17.71
7	60	80	10	15.12	15.32
8	60	50	30	15.78	15.97
9	60	65	20	18.01	17.90
10	60	65	20	17.64	17.81
11	60	65	20	17.83	17.96
12	60	65	20	17.44	17.65
13	60	50	10	15.59	15.54
14	80	80	20	14.27	14.51
15	80	65	10	14.95	14.82
16	80	50	20	14.63	14.79
17	80	65	30	15.04	15.03

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین تاثیر متغیرهای مستقل بر بازده استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی صدفی

۳-۱-۱- تاثیر توان امواج فراصوت

توان امواج از فاکتورهای موثر بر استخراج پلی‌ساکاریدها به روش فراصوت می‌باشد. در تحقیقات متعدد از روش فراصوت به منظور تسریع فرایند استخراج بویژه در دمای پایین جهت جلوگیری از تغییرات ساختاری و مولکولی پلی‌ساکاریدهای استخراجی و حفظ خواص زیستی آن‌ها استفاده شده است [۲۸-۲۵]. شکل ۱-a اثر توان‌های مختلف بر بازده استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی را در حالی‌که دو متغیر دیگر یعنی زمان و دمای استخراج در نقطه مرکزی ثابت نگه داشته شدند را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱-a می‌توان مشاهده نمود، با افزایش قدرت امواج تا حدود ٦٥ درصد توان دستگاه، میزان بازده پلی‌ساکارید استحصالی افزایش یافت اما در توان‌های بالاتر کاهش یافت. دلیل افزایش راندمان هنگام به‌کارگیری سطوح مناسب امواج آن است که با عبور امواج صوت از میان محیط مایع، حباب‌های زیادی ایجاد می‌شود. از طرفی دما و فشار در داخل حباب‌ها بسیار بالا بوده و حباب‌ها در مدت زمان خیلی کوتاه فرو می‌پاشند. شوک شدید امواج و سرعت بالای آنها، نفوذ حلال به داخل بافت‌های گیاهی را تسریع کرده و به‌این‌ترتیب مواد بین سلولی از طریق تجزیه دیواره سلولی رها شده و وارد حلال می‌شوند [۲۵]. در هر حال، استفاده از توان بالا نیز می‌تواند سبب تجزیه ترکیبات سلولی نظیر پلی‌ساکاریدها و در نتیجه کاهش راندمان استخراج گردد [۲۷].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

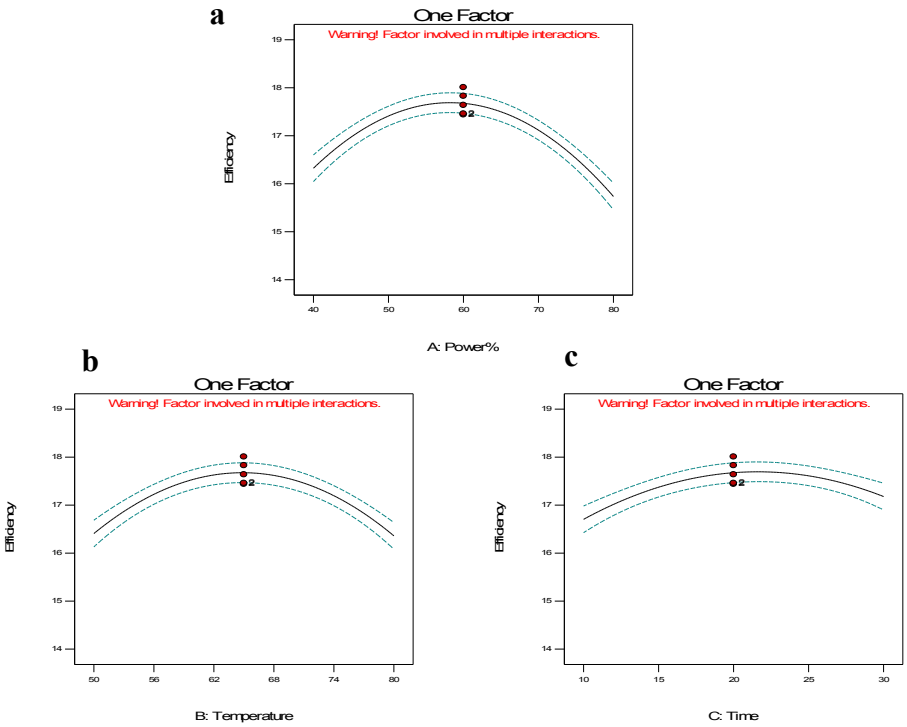

Fig 1 Effect of different percentage of ultrasonic power (a), temperature (b) and time (c) on the yield of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*

نتایج پژوهش حاضر با نتایج تهموزی[۲۸] و جوینده و همکاران [۲۹] مطابقت داشت. تهموزی اثر توان امواج فراصوت در محدوده ۱۰۰ تا ۲۷۵ وات را بر میزان استخراج پلی‌ساکارید از برگ درخت بلوط مورد بررسی قرار داد و مشاهده نمود که با افزایش توان امواج فراصوت، راندمان استخراج بیشتر می‌شود. وی دلیل افزایش راندمان را افزایش ضریب انتشار پلی‌ساکاریدها و افزایش حلالیت آنها در توان‌های بالا عنوان نموده است. جوینده و همکاران [۲۹] نیز در بررسی تعیین شرایط بهینه استخراج پلی‌ساکارید از میوه گیاه قره‌قاط با استفاده از امواج فراصوت در محدوده ۱۴۰-۶۰ وات نشان دادند که با افزایش توان ابتدا میزان استخراج افزایش می‌یابد اما در صورت بهره‌گیری از توان‌های بالاتر میزان استخراج پلی‌ساکارید کاهش می‌یابد. یانگ گوآنگ و همکاران (۲۰۱۲) اثر توان ۱۸۰ تا ۴۳۰ وات را بر نوعی گیاه دارویی به‌نام آترکتیس بررسی نمودند و نشان دادند که با افزایش توان، راندمان استخراج به دلیل پدیده حفره‌زایی یا کاویتاسیون[1] افزایش می‌یابد [۳۰]. Zou و همکاران تاثیر توان امواج فراصوت بر میزان بازده استخراج پلی‌ساکارید از گیاه دارویی *کدنوپسیس پیلوسالا*[2] را بررسی نمودند و گزارش نمودند که با افزایش توان تا ۳۲۰ وات راندمان افزایش یافته اما استفاده از توان‌های بالاتر از آن تأثیری در این زمینه ندارد [۳۱]. امواج فراصوت می‌تواند از طریق ایجاد حباب‌های میکروسکوپی تأثیرگذار باشد. نوع و تعداد حباب‌های ایجاد شده و فروپاشی شده، بستگی مستقیم به شدت امواج فراصوت دارد. حباب‌های فروپاشی شده، گرادیان‌های برشی بالا و شوک‌های مکانیکی بوجود می‌آورند که باعث فروپاشیدن دیواره های سلولی می‌شود. به این‌ترتیب امواج فراصوت با تأثیر بر میزان نفوذ حلال به سلول ها، خروج اجزاء از سلول به حلال را شتاب بخشیده و در نتیجه سرعت انتقال جرم را افزایش می‌دهد [۲۶].

۳-۱-۲- تاثیر دمای استخراج

شکل ۱-b تاثیر دماهای مختلف امواج دهی را بر راندمان استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی نشان می‌دهد. در این حالت زمان امواج دهی و توان امواج فراصوت به ترتیب در نقطه مرکزی (۲۰ دقیقه و ۶۵ درصد توان دستگاه) ثابت نگه داشته شدند. همان‌طور که در شکل ۱-b نشان داده شده است، بازده استخراج پلی‌ساکارید به طور خطی با افزایش دما تا حدود ۶۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. دلیل افزایش راندمان با افزایش دما آن است که دمای بالا سبب کاهش ویسکوزیته، تسریع حرکت مولکولی و افزایش ضریب هدایت حلال به داخل ماده جامد می‌شود؛ در نتیجه سبب افزایش حلالیت و انتشار مواد گیاهی مورد هدف به داخل محلول و

1. Cavitation
2. *Codonopsis pilosula*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

افزایش راندمان استخراج می‌شود. اگرچه ثابت شده است افزایش دما، محدودیت‌هایی هم دارد و علاوه بر اینکه هزینه استخراج افزایش می‌یابد اثر معکوس در راندمان دارد و می‌تواند سبب کاهش بازده شود زیرا ترکیبات مورد هدف تجزیه شده و درنتیجه ناخالصی و مواد نامحلول نیز وارد عصاره می‌شود [۳۲].

در پژوهشی که توسط Wang و همکاران روی پلی‌ساکاریدهای یک نوع گیاه دارویی ترامیتیس صورت گرفت افزایش دما از ٤٠ به ٦٠ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش راندمان استخراج شد. افزایش دما سبب افزایش انتشار پلی‌ساکاریدها و افزایش حلالیت آنها می‌شود که با نتایج بدست آمده در این تحقیق و سایر پژوهش‌های انجام شده مطابقت داشت [۳۳]. Chen و همکاران اثر دماهای مختلف را بر راندمان استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند با افزایش دما تا ٦٠ درجه‌سانتی‌گراد راندمان افزایش می‌یابد [۳۵]. این محققین علت افزایش راندمان استخراج هنگام افزایش دما را کاهش ویسکوزیته عنوان نمودند چراکه در این شرایط حلال بهتر به داخل ماتریکس جامد نفوذ می‌کند و درنتیجه انتقال جرم سریعتر و آسان‌تر صورت می‌گیرد. همچنین رحیمی و همکاران [٣٦] در تحقیقی در مورد بررسی شرایط استخراج پلی‌ساکارید از جلبک *E. intestinalis* با استفاده از امواج فراصوت گزارش نمودند که میزان راندمان استخراج با افزایش دما از ۳۰ به ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و از ۲/٦٨ به ۸/۵۷ درصد می‌رسد. در هرحال برخلاف نتایج فوق، وانگ و همکاران وی راندمان بسیار بالاتر استخراج پلی‌ساکاید را در دمای محیط و شرایط قلیایی نسبت به استخراج با آب داغ ۹۰ درجه سانتی‌گراد گزارش نمودند [١٤].

۳-۱-۳- تأثیر زمان استخراج

شکل ۱-c تاثیر زمان امواج‌دهی در سطوح مختلف را بر بازده استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی نشان می‌دهد؛ ضمن آن‌که دو متغیر دیگر یعنی دمای استخراج و توان امواج فراصوت به‌ترتیب در نقطه مرکزی ٦٥ درجه سانتی‌گراد و ٦٠ درصد ثابت نگاه داشته شدند. همان‌طور که در شکل ۱-c مشاهده می‌شود، با افزایش زمان از ۱۰ به ۳۰ دقیقه، راندمان استخراج افزایش یافت. این وضعیت به‌دلیل افزایش در معرض قرار گرفتن پلی‌ساکاریدها در محیط آبی و نفوذ آب به ماده‌خام خشک می‌باشد که سبب افزایش میزان پلی‌ساکاریدها حل شده و خروج آن از ماده خام به‌طریق انتشار می‌گردد. علاوه بر این افزایش دمای استخراج، حلالیت پلی ساکاریدها را افزایش خواهد داد و درجه بالاتری از استخراج را ارائه می‌کند [۳۲].

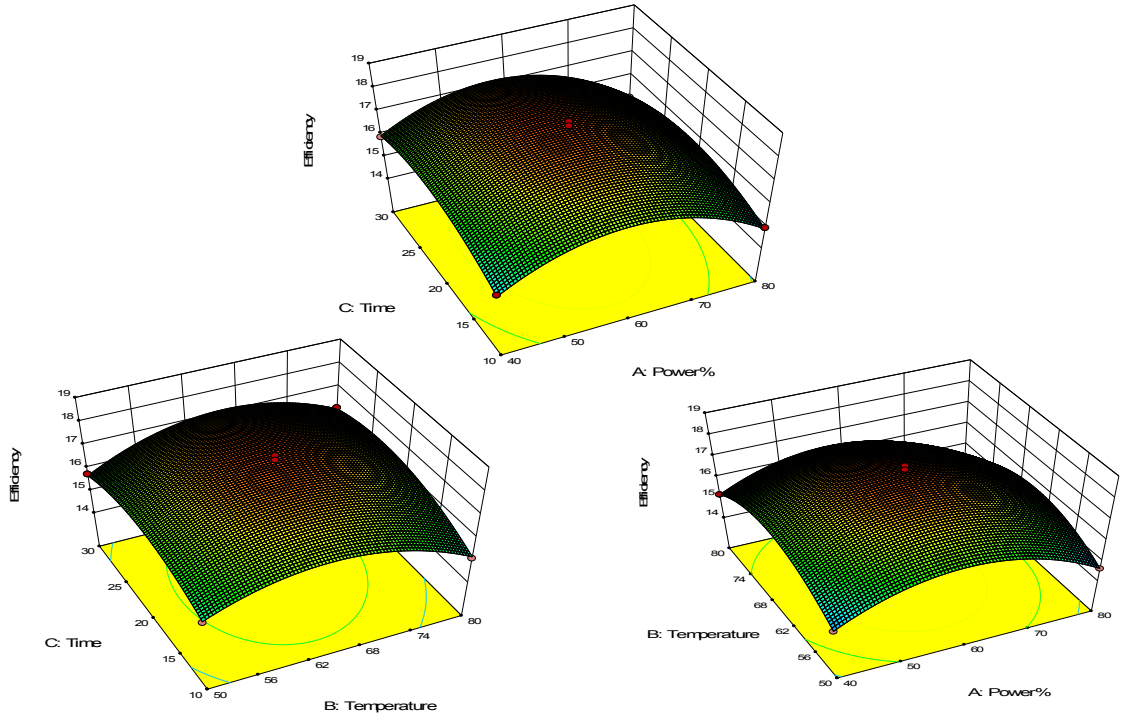

Fig 2 Response surface plots showing the significant intraction effects of different variables on the yield of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

نتایج تحقیق حاضر با نتایج Wang و همکاران [۳۳] همخوانی داشت. این افراد افزایش راندمان استخراج پلی‌ساکارید از گیاه *ترامیتیس روبینیوفیلا* را همگام با افزایش زمان استخراج با کمک امواج فراصوت گزارش نمودند. درهرحال، بر اساس نتایج این محققین، استفاده از زمان های بالاتر سبب تجزیه پلی‌ساکاریدها به دلیل ناپایداری در برابر حرارت می‌گردید. Zhong و Wang نیز نشان دادندکه با افزایش زمان امواج‌دهی، راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها از پالپ میوه لانگان افزایش می‌یابد [۳٤]. این محققین دلیل افزایش راندمان را به شکل‌گیری تعداد بیشتر حباب‌های کاویتاسیون و افزایش انتقال جرم نسبت دادند. درهرحال، برخلاف نتایج تحقیق حاضر، یانگ-گوانگ و همکاران گزارش نمودند که افزایش زمان امواج‌دهی تاثیر چندانی بر بازده استخراج ندارد چرا که هرچند با افزایش زمان امواج‌دهی میزان استخراج افزایش می‌یابد اما به‌دلیل هیدرولیز پلی‌ساکاریدها راندمان استخراج درنهایت تغییری نمی‌کند [۳۰].

۳-۱-٤- بررسی اثر متقابل متغیرهای مورد بررسی بر بازده استخراج پلی‌ساکارید

در به‌کارگیری طراحی آزمایش، علاوه بر امکان پیش‌بینی مقدار بهینه‌ی متغیرها و نیز بررسی جداگانه‌ی اثر هر کدام از آن‌ها در راندمان استخراج، می‌توان برهمکنش‌های موجود بین متغیرها را در قالب نمودار سه‌بعدی مشاهده کرد. شکل ۲ نمودارهای سه بعدی سطح مربوط به اثرات متقابل متغیرهای مورد آزمون را بر میزان راندمان پلی‌ساکارید استخراج شده نشان می‌دهد. با توجه به نتایج ارایه شده در جدول ۳، تمامی اثرات متقابل معنی‌دار گردید و تمامی متغیرهای مورد بررسی توان-زمان، دما-زمان و توان-دما بر کارایی استخراج پلی-ساکارید اثری افزایشی داشتند (شکل ۲). شکل ۲-a نمودار سه بعدی سطح پاسخ اثر متقابل توان و زمان را هنگامی که دما در نقطه مرکزی (٦٥ ^{o}C) ثابت نگهداشته شده است نشان می‌دهد. همان‌گونه که قبلاً اشاره گردید، علت افزایش میزان استخراج پلی‌ساکارید در نتیجه‌ی افزایش همزمان توان امواج و زمان استخراج به‌ترتیب به‌دلیل افزایش کاویتاسیون حباب‌های تشکیل شده و انتقال جرم می‌باشد. شکل ۲-b نمودار سه بعدی سطح پاسخ اثر متقابل زمان و دما را هنگامی که توان در نقطه مرکزی (٦۰ درصد) ثابت نگهداشته شده است نشان می-دهد. همانطوری که می‌توان مشاهده نمود، دو متغیر مذکور به-طور همزمان و تا حدی معین سبب افزایش میزان استخراج گردیده‌اند. نمودار ۲-c نیز به‌طور مشابه، اثر افزایشی دو متغیر توان و دما را هنگامی که زمان در نقطه مرکزی (۲۰ min) ثابت نگهداشته شده است نشان می‌دهد.

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic polynomial model

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Model	24.34	9	2.70	70.99	< 0.0001***
A: Ultrasonic power	0.69	1	0.69	18.12	0.0038**
B: Extraction temperature	0.0045	1	0.0045	0.12	0.7408^{ns}
C: Sonication time	0.45	1	0.45	11.84	0.0108*
AB	0.11	1	0.11	2.95	0.1298 ^{ns}
AC	0.073	1	0.073	1.91	0.2091 ^{ns}
BC	0.16	1	0.16	4.20	0.0796 ^{ns}
A^2	11.42	1	11.42	299.69	< 0.0001***
B^2	7.03	1	7.03	184.41	< 0.0001***
C^2	2.27	1	2.27	59.58	0.0001***
Residual	0.27	7	0.038		
Lack of Fit	0.028	3	0.009	0.16	0.9212 ^{ns}

۳-۲- آنالیز آماری و بررسی کارآمدی مدل

نتایج بازده استخراج پلی‌ساکارید اندازه‌گیری و پیش‌بینی شده مربوط به ۱۷ آزمایش انجام شده براساس مدل طرح Box–Behnken در جدول ۲ نشان داده شده است. چنان‌که مشاهده می‌شود، مقادیر تجربی اندازه‌گیری شده با مقادیر پیش‌بینی شده تطابق بالایی را نشان می‌دهند. با توجه به نتایج به‌دست آمده

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

در جدول ۲، بیشترین بازده استخراج درصورت به‌کارگیری ۶۰ درصد توان امواج فراصوت در دمای ۶۵°C و مدت زمان ۲۰ دقیقه به‌دست خواهد آمد. مطابق نتایج آنالیز داده‌ها (جدول ۳)، میزان بازده استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی با تابع درجه دوم سه متغیر مورد بررسی در ارتباط بود و همگی تأثیر معنی‌داری بر بازده استخراج داشتند ($p<۰/۰۱$). به‌عبارت دیگر، با توجه به ضرایب به دست آمده، رابطهٔ غیرخطی بین متغیرهای مستقل و بازده استخراج پلی‌ساکارید برقرار می‌باشد. همچنین، بر اساس نتایج آنالیز واریانس داده‌ها، مقادیر عددی R^2 و R^2-adj و Pre R^2 به‌ترتیب ۰/۹۸۹، ۰/۹۷۵ و ۰/۹۶۷ تعیین شد. مقادیر عددی R^2 و R^2-adj حاکی از این موضوع است که مدل رگرسیون تا چه حد می‌تواند تعیین کننده انحراف داده‌ها باشد و هر چه این مقادیر به واحد نزدیک باشد، پاسخ به دست آمده از مدل تجربی، به اعداد واقعی نزدیک‌تر است. همچنین مقادیر CV و PRESS به‌ترتیب ۱/۲۲ و ۰/۸۲ به‌دست آمد. بنابراین، با توجه به نتایج پارامترهای آماری حاصل از برازش مدل درجه‌ی دوم بر داده‌های تجربی می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که معادله پیشنهادی به‌خوبی می‌تواند ارتباط بین متغیرهای استخراج (دمای استخراج، زمان استخراج و توان امواج فراصوت) و بازده پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی را نشان دهد. با استفاده از روش آماری سطح پاسخ، معادله‌ی ۵ به عنوان مدل رگرسیونی برای پیش‌بینی میزان بازده استخراج پلی‌ساکارید به دست آمد که ارتباط تجربی بین میزان بازده پلی ساکارید استخراجی و متغیرهای آزمایش را نشان می‌دهد.

معادله ۵

$$Y= -۲۵/۰۸۲۹ + ۰/۵۲۹۱X_۱ + ۰/۷۵۱۶X_۲ + ۰/۲۷۱۳X_۳ - ۰/۰۰۰۶X_۱X_۲ - ۰/۰۰۰۷X_۱X + ۰/۰۰۱۳X_۲X_۳ - ۰/۰۰۴۱X_۱^۲ - ۰/۰۰۵۷X_۲^۲ - ۰/۰۰۷۳X_۳^۲$$

۳-۳- بهینه‌یابی فرآیند استخراج پلی‌ساکارید

شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی با استفاده از تکنیک بهینه سازی عددی با نرم افزار Design-Expert نسخه ۱۱ بررسی گردید. بدین منظور در ابتدا شرایط بهینه توسط نرم افزار انتخاب گردید.

شرایط بهینه شامل توان امواج فراصوت ۳۳۷ وات (معادل ۵۸/۰۶ درصد)، زمان امواج دهی ۲۱/۷۲ دقیقه و دمای استخراج ۶۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد باعث بیشترین بازده (۱۷/۷۱ درصد) استخراج گردید (شکل ۳). برخلاف نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، Kan و همکاران [۱۱] میزان راندمان پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ جان‌افزا (*Ganoderma lucidum*) در شرایط بهینه را بسیار پایینتر و مقدار ۲/۴۴ درصد و Zhang و همکاران [۱۲] مقدار راندمان پلی‌ساکارید استخراجی از قارچ شاه صدف (*Pleurotus eryngii*) بسیار بالاتر و مقدار ۳۴/۳ درصد گزارش نمودند. در هرحال در اکثر تحقیقات انجام شده در زمینه استخراج پلی‌ساکارید از گیاهان و انواع مختلف جلبک و قارچ، میزان راندمان پلی‌ساکارید استخراجی در محدوده نتایج به‌دست آمده در این تحقیق گزارش شده است که از جمله می‌توان به میزان راندمان قارچ گوش ژله‌ای (*Auricularia auricula*) با ۱۰/۴۶ درصد [۱۳]، جلبک *E. intestinalis* با ۸/۵۷ درصد [۳۶]، میوه قره‌قاط با ۱۳/۶۱ درصد و سرشاخه گل‌دار گیاه گل راعی با راندمان ۶/۶۹ درصد [۳۷] اشاره نمود.

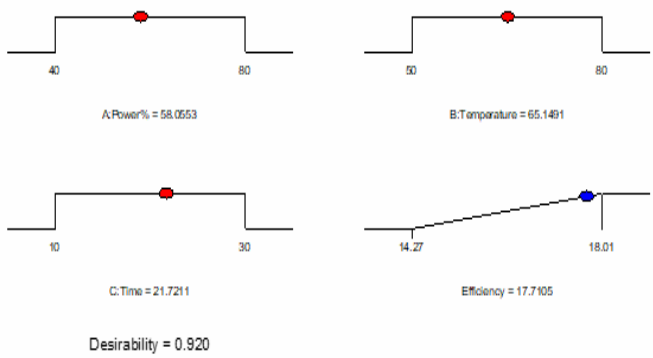

Fig 3 Schematic representation of the optimum values of factors, response and the corresponding levels

همچنین برای بررسی درستی و صحت نتایج حاصل از مدل، در شرایط آزمایشگاه در نقاط بهینه‌ای که نرم افزار داده بود یک آزمایش در ۳ تکرار انجام شد که نتایج آن در جدول ٤ آورده شده است. طبق این جدول، راندمان تجربی ۱۷/۵۸ درصد و راندمان پیش بینی شده ۱۷/۷۱ درصد شد. همانطور که مشاهده می‌شود اختلاف چندانی میان نتیجه پیش‌بینی شده توسط مدل و نتیجه به‌دست آمده از کار آزمایشگاهی مشاهده نمی‌شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

Table 4 Performance of models in predicting the yield of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*

Optimized conditions			Extraction yield		
Ultrasonic power (%)	Extraction temperature (°C)	Sonication time (min)	Experimented	predicted	Desirability
58.06	65.15	21.72	17.58 ± 0.19	17.71	0.92

۳-٤- ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی

۳-٤-۱- تعیین توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل (OH)

در بین انواع اکسیژن‌های واکنش دهنده، رادیکال هیدروکسیل فعال‌ترین رادیکال آزاد است که به همه مولکول‌های زیستی با شروع واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال آزاد حمله می‌کند[۳۸]. رادیکال‌های هیدروکسیل می‌توانند تقریباً با همه مولکولهای بزرگ زیستی حمل کننده در سلول‌های زنده واکنش دهند و آسیب جدی به مولکول‌های زیستی مجاور وارد کنند [۳۹]. با توجه به تعریف بالا، حذف رادیکال هیدروکسیل (OH) برای دفاع از سیستم‌های غذایی یا سلولی در برابر اکسیداسیون بسیار مهم است. با توجه به شکل ٤، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلی-ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی باتوجه به توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل در غلظت‌های ppm ۳۰۰-۵۰ بررسی گردید. همانطور که از شکل ٤ پیداست، توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل توسط پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی وابسته به غلظت می باشد. همچنین، میزان مهارشدن رادیکال‌های هیدروکسیل توسط آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT در غلظت ppm ۳۰۰، (۹۰ درصد) می‌باشد که این میزان برای پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی در غلظت مشابه، ٤٦ درصد است. توانایی جذب رادیکال هیدروکسیل توسط پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی در این تحقیق کمتر از مقادیر گزارش شده برای پلی‌ساکارید استخراج شده از میوه *Ziziphus lotus* (۹۱ درصد) [٤۰]، پلی‌ساکارید استخراج شده از برگ *Hibiscus rosa-sinensis* (٦۰ درصد) [٤۱] و پلی‌ساکارید استخراج شده از برگ *Cordia myxa* (۹۰ درصد) [٤۲] در غلظت مشابه ppm ۳۰۰ بود.

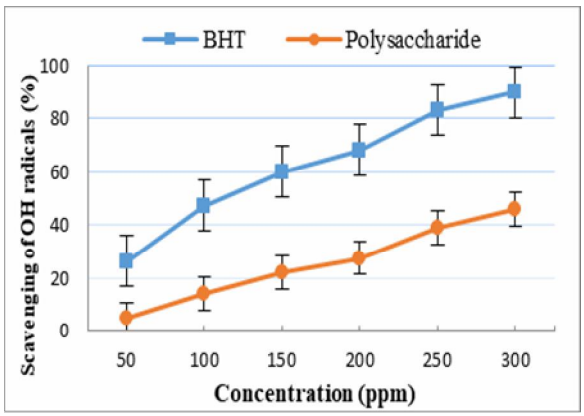

Fig 4 Capability of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* on scavenging of OH radicals at different concentrations

۳-٤-۲- تعیین توانایی جذب رادیکال DPPH

DPPH، رادیکال آزاد پایداری است که به‌طور گسترده به عنوان ابزاری برای تعیین مهار رادیکال آزاد، توسط پلی‌ساکاریدها پذیرفته شده است [٤۳]. خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراجی از قارچ خوراکی صدفی در توانایی مهار یا جذب رادیکال‌های DPPH در شکل ۵ نشان داده شده است. چنانکه در شکل ۵ مشاهده می‌شود، فعالیت جذب رادیکال DPPH با افزایش غلظت پلی‌ساکارید افزایش یافت. نتایج نشان داد که پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی ظرفیت آنتی‌اکسیدان قابل قبولی داشته و توانسته است بر رادیکال‌های آزاد DPPH بویژه در غلظت‌های بالا تأثیر بگذارد. درهرحال، جذب رادیکال آزاد DPPH توسط اسید آسکوربیک به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بیشتر از پلی‌ساکارید بدست آمده در این تحقیق بود که نشان‌دهنده توانایی کمتر پلی‌ساکارید مورد مطالعه در شدت الکترون دهندگی آن می-باشد [۳۹].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

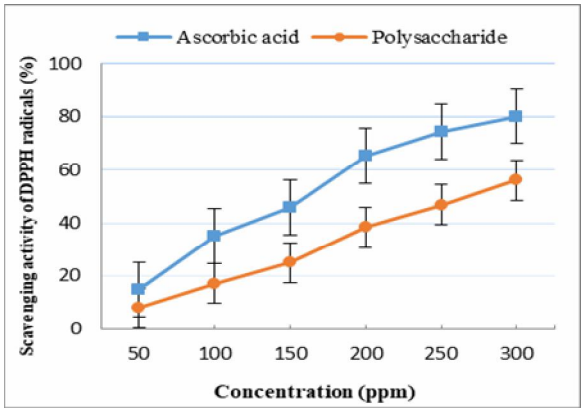

Fig 5 Antioxidant activity of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* in terms of scavenging activity of DPPH radicals at different concentrations

میزان جذب رادیکال DPPH در غلظت ppm ۳۰۰ توسط اسید آسکوربیک ۸۰ درصد بود درحالی که این میزان برای پلی‌ساکارید مورد مطالعه در این تحقیق در غلظت مشابه تنها ۵۶ درصد بود. میزان جذب رادیکال DPPH توسط پلی-ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی کمتر از مقادیر گزارش شده برای پلی‌ساکارید استخراج شده از میوه *Assyrian pulm* (۸۵ درصد) [٤٤]، پلی‌ساکارید محلول در آب استخراج شده از *Spirulina platensis* (۷۸ درصد) [۱۰]، پلی‌ساکارید استخراج شده از برگ *Althaea rosea* (۸٤ درصد) [٤٥] و عصاره خام استخراج شده از برگ گیاه پنیرک یا *Malva neglecta* (۸۵ درصد) [٤٦] در غلظت برابر ppm ۳۰۰ بود. هرچند خواص آنتی‌اکسیدانی قابل قبول پلی‌ساکارید استخراج شده می‌تواند به‌دلیل وجود ترکیبات اسید دی-گالاکتورونیک و نیز ترکیبات فنلی متصل به پلی‌ساکاریدها باشد [٤٧]، اما دلیل پایین بودن خواص آنتی‌اکسیدانی پلی-ساکارید استخراج شده احتمالاً می‌تواند به‌دلیل روش استخراج مورد استفاده باشد چرا که در حین شستشو با اتانول، ترکیبات مهم آنتی‌اکسیدانی نظیر مواد فنولی آزاد کاهش قابل توجهی می‌یابد [٤٨]. درهرحال Vamanu [٤٩] در نتایج کاملاً مشابه و در بررسی خواص مهارشدگی رادیکال‌های هیدروکسیل توسط نمونه‌های پلی‌ساکارید استخراج شده از میسلیوم دو واریته قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) مقدار پایینتر توانایی جذب رادیکال هیدروکسیل را در تمامی نمونه‌های پلی‌ساکارید استخراجی نسبت به اسید آسکوربیک گزارش نمودند.

٤- نتیجه‌گیری کلی

قارچ‌ها از دیرباز به لحاظ خواص دارویی در کشورهای شرق آسیا مورد توجه بوده‌اند به‌طوری‌که مردم این کشورها به‌طور سنتی از قارچ‌های خوراکی به‌عنوان اکسیر زندگی و تقویت کننده روح و جسم استفاده می‌کردند. امروزه به دلیل خواص غذایی و دارویی قابل توجه پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ صدفی *Pleurotus ostreatus*، تولید آن در بسیاری از نقاط دنیا مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین این تحقیق به منظور بررسی میزان راندمان پلی‌ساکارید محلول در آب استخراجی از قارچ صدفی در شرایط مختلف استخراج و با کمک امواج فراصوت انجام پذیرفت. نتایج نشان داد مدل به‌دست آمده در این پژوهش از R^2 و $Adj\text{-}R^2$ بالا و معنی‌دار و C.V. (ضریب تغییرات) پایین و PRESS مناسبی برخوردار بوده و آزمون عدم برازش معنی‌دار نگردید که نشان‌دهنده‌ی کارایی مدل ارئه شده در پیش بینی پارامترهای مورد ارزیابی است. همچنین اختلاف چندانی میان مقادیر بازده استخراج تجربی و پیش‌بینی شده وجود نداشت و مدل توانست با مطلوبیت بسیار بالایی (۰/۹۲ درصد) نتایج تجربی را به خوبی پیش‌بینی کند. هر چند ویژگی آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید مورد مطالعه در این تحقیق در مقایسه با بسیاری از پلی‌ساکاریدهای استخراجی از گیاهان دارویی پایین‌تر می‌باشد، اما با توجه به قیمت بالای این پلی‌ساکارید (حدود ۱ دلار به ازاء هر گرم)، استخراج و تولید این پلی‌ساکارید به‌عنوان مکمل غذایی و سلامت‌بخش توصیه می‌گردد.

۵- سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی به شماره ۹٦۱/۰۱ است و نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت‌های مالی و معنوی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۵- منابع

[1] Lindequist, U, Niedermeyer, T.M.J., Jülich, W.D. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based compl. Alt. Medicine.* 2, 285- 299.
[2] Pan, Y., Dong, S., Hao, Y., Zhou, Y.,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

Ren, X., Wang, J., Wang, W., Chu, T. (2010). Ultrasonic-assisted extraction process of crude polysaccharides from Yunzhi mushroom and its effect on hydroxyproline and glycosaminoglycan levels. *Carbohydr. Polym.*, 81(1), 93-96.

[3] Badalyan, S.M., Gharibyan, N.G., Kocharyan, A.E. (2007). Perspective in usage of bioactive substances of medicinal mushrooms in pharmaceutical and cosmetic industry. *Int. J. Med. Mushr.*, 9(3), 275-280.

[4] Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J., Zhou, Sh. (2004). A phase I/II study of Ling Zhi mushroom Ganoderma lucidum (W. curt.: Fr.) Lioyd (*Aphyllophoro mycetideae*) extract in patients with type II diabetes mellitus. *Int. J. Med. Mushr.*, 6(1), 33-9.

[5] Zhang, H.N., Lin, Z.B. (2004). Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 25, 191-195.

[6] Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y., Hayashi, T. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta. Med.*, 51(4), 339 - 40.

[7] Apel K, Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 55, 373–99.

[8] Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods*, 18, 757-781.

[9] Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chem. Toxicol.*, 33(7), 601-617.

[10] Kurd, F., Samavati, V. (2015). Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 74, 498–504.

[11] Kan, Y., Chen, T., Wu, Y., Wu, J., Wu, J. (2015). Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 72, 151–157.

[12] Zhang, A., Li, X., Chen, X., Yang, J., Sun, P. (2014). Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 65, 28-32.

[13] Zou, Y., Jiang, A., Tian, M. (2015). Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricula* fruiting bodies. *Food Sci. Technol.*, 35(3), 428-433.

[14] Wang, P., Chen, D., Jiang, D., Dong, X., Chen, P., Lin, Y. (2014). Alkali extraction and in vitro antioxidant activity of *Monascus* mycelium polysaccharides. J. *Food Sci. Technol.*, 51(7), 1251-1259.

[15] Bellettini, M.B., Fiorda, F.A., Maieves, H.A., Teixeira, G.L., Avila, S., Hornung, P.S., Junior, A.M., Ribani, R.H. (2016). Fators aecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi J. Biol. Sci.*, In press, Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005.

[16] Savoie, J.M., Salmones, D., Mata, G., (2007). Hydrogen peroxide concentration measured in cultivation substrates during growth and fruiting of the mushrooms. Agaricus bisporus and Pleurotus spp. *J. Sci. Food Agric.* 87, 1337–1344.

[17] Sanchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 1321-1337.

[18] Jedinak, A., Sliva, D. (2009). *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. *Int. J. Oncol.*, 33(6), 1307-1313.

[19] Bobek P., Galbavy, S. (1999). Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. *Nahrung.*, 43, 339–342.

[20] Bobek P, Ozdin L, Kuniak L. (1995). Antioxidative effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in hypercholesterolemic rat. *Pharmazie*, 50(6), 441–442.

[21] Kunjadia P.D., Nagee A., Pandya P.Y., Mukhopadhyaya, P.N., Sanghvi, G.V. Dave, G.S. (2014). Medicinal and antimicrobial role of the oyster culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (higher Basidiomycetes) cultivated on banana agrowastes in India. *Int. J. Med. Mushr.*, 16(3), 227-38.

[22] Mazarei, F., Jooyandeh, H., Hojjati, M., Noshad, M. (2017). Polysaccharide of caper (Capparis spinose L.) Leaf: Extraction, optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 95, 224–231.

[23] Zhong, K., Lin, W., Wang, Q., Zhou, S. (2012). Extraction and radicals scavenging activity of polysaccharides with microwave

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

extraction from mung bean hulls. *Int. J. Biol. Macromolec*., 51, 612–617.

[24] Blios, M.S. (1958). Antioxidant determinantions by the use of a stable free radical. *Nature*., 26,1199-1200.

[25] Solisova, M., Toma, S., Mason, T.J. (1997). Comparision of conventional and ultrasonically assosted extractions of pharmaceutically active compounds from *Solvia officinalis*. *Ultrason. Sonochem.*, 4, 131-134.

[26] Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., Chemat, F. (2010). Ultrasound assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem*., 119(2), 851–858.

[27] Li H., Pordesimo L., Weiss J., (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Res. Int.,* 37, 731–738.

[28] Tahmouzi, S. (2014). Optimization of polysaccharides from Zagros oak leaf using RSM: Antioxidant and antimicrobial activities. *Carbohydr. Polym.*, 106, 238–246.

[28] Jooyandeh, H., Noshad, M., Khamirian, R.A. (2018). Modeling of ultrasound-assisted extraction, characterization and in vitro pharmacological potential of polysaccharides from *Vaccinium arctostaphylos* L. 2017. *Int. J. Biol. Macromol.*, 107, 938-948.

[30] Yong-guang, B., Ding-long, H., XIAO-jun, Y., Yu-min, L., Min-xia, H. (2012). Study on ultrasonic-assisted extraction of polysaccharide of *Atractylis macroceohala koidz* of experiment, *Energy Procedia*, 7, 1778–1785.

[31] Zou, Y., Chen, X., Yang, W., Liu, Sh. (2011). Response surface methodology for optimization of the ultrasonic extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula*, *Carbohydr. Polym.*, 84, 503–508.

[32] Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.*, 95, 588-598.

[33] Wang, Y., Liua, Y., Hu, Y. (2014). Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. *Carbohydr. Polym*., 93, 47–56.

[34] Zhong, K., Wang, Q. (2010). Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydr. Polym*., 80, 19-25.

[35] Chen, W., Wang, W.P., Zhang, H. Sh., Huang, Q. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.*, 87, 614-619.

[36] Rahimi, F., Tabarsa, M., Rezaei, M. (2016). Ulvan from green algae *Ulvain testinalis*: Optimization of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity. *J. Appl. Phycol*., 28, 2979–2990.

[37] Heydarian, M., Jooyandeh, H., Nasehi, B., Noshad, M. (2017). Characterization of *Hypericum perforatum* polysaccharides with antioxidant and antimicrobial activities: Optimization based statistical modeling. International Journal of Biological Macromolecules 104 (2017) 287–293.

[38] Barry, H., Susanna, C. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 715–725.

[39] Lai, F., Wen, Q., Li, L., Wu, H., Li, X. (2010). Antioxidant activities of water-solublepolysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonicassisted treatment. *Carbohydr. Polym.*, 81, 323–329.

[40] Adeli, M., Samavati, V. (2015). Studies on the steady shear flow behavior and chemical properties of water-soluble polysaccharide from *Ziziphus lotus* fruit. *Int. J. Biol. Macromolec*., 72, 580–587.

[41] Afshari, K., Samavati, V., Shahidi S.A. (2015). Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. *Int. J. Biol. Macromolec*., 74, 558–567.

[42] Samavati, V., Lorestani, M. & Joolazadeh, S. (2014). Identification and characterization of hydrocolloid from *Cordia myxa* leaf. *Int. J. Biol. Macromolec*., 65, 215–221.

[43] Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C., Martin Lo, Y. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydr. Polym.*, 88, 522–529.

[44] Samavati, V., Skandari, F. (2014). Recovery, chemical and rheological characterization of gum from *Assyrian pulm.*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

Int. J. Biol. Macromolec., 67, 172–179.

[45] Eskandari, M., Samavati, V. (2015). Sono-assisted extraction of alcohol-insoluble extract from *Althaea rosea*: Purification and chemical analysis. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 72, 347–355.

[46] Jooyandeh, H., Samavati, V. (2017). Extraction of crude extract from *Malva neglecta* leaves and evaluation of its free radical scavenging activities· *Iranian Food Sci. Technol. Res. J.*, 13(1), 167-179.

[47] Qi, H., Liu, X., Ma, J., Zhang, Q., Li, Z. (2010). In vitro antioxidant activity of acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *J. Med. Plants Res.*, 4(23), 2445-2451.

[48] Balasundram, N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99, 191–203.

[49] Vamanu, E. (2012). Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *J. Biomed. Biotechnol.*, Article ID 565974, 1-8.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]

Extraction of polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* by ultrasound and evaluation of its antioxidant activity

Jooyandeh, H. [1*], Haji-Ebrahimi Forushani, Z. [2]

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani

2. MSC in Food Science and Technology

(Received: 2018/05/04 Accepted:2019/01/23)

The aim of this study was to investigate the effect of ultrasound power at 40 to 80 percent (equal to 232-464 W), extraction temperature (50 to 80 °C) and extraction time (10 to 30 min) on the soluble polysaccharide extraction from the *Pleurotus ostreatus*. The response surface methodology using Box-Behnken design (with three variables, three levels and 5 replications at central point) was applied to optimize extraction conditions and evaluation of the effects of main factors and their interactions. Antioxidant activity (scavenging ability of OH and DPPH) of extracted polysaccharide were also evaluated. Optimization of polysaccharide extraction yield using response surface methodology indicated that combination of the ultrasonic power of 58.06 percent (~337 W), extraction temperature of 65.15 °C and extraction time of 21.72 min resulted in maximum extraction yield (17.71%). Among three independent variables, ultrasonic power had the highest and temperature had the lowest impact on the rate of extraction. The results from antioxidant activity evaluation showed that even though extracted polysaccharide had lower absorbance capacity of the free radicals in comparison with control samples (ascorbic acid and BHT), but it revealed an acceptable antioxidant property.

Key words: Optimization, *Pleurotus ostreatus,* Response surface methodology, Antioxidant activity

[*] Corresponding Author E-Mail Address: hosjooy@asnrukh.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-08]