

تأثیر فراصوت بر استخراج پلی ساکاریدها از غلاف نخود فرنگی

مریم جلیلی صفریان^۱، علی گنجلو^{۲*}، ماندانا بی مکر^۲، سهیلا زرین قلمی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۰۶)

چکیده

پلی ساکاریدها به عنوان مولکول‌های بزرگ زیستی نقش مهمی در رژیم غذایی جهت مهار رادیکال‌های آزاد برای پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو ایفا می‌کنند. در این پژوهش، تأثیرات قدرت (۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰ وات) و دوره کاری (۱۰۰-۵۰ درصد) امواج فراصوت در فرکانس ۲۴ کیلوهرتز بر راندمان استخراج پلی ساکاریدها از غلاف نخود فرنگی به عنوان یکی از ضایعات کارخانجات فراوری مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. استخراج پلی ساکاریدها تحت شرایط ثابت شامل درجه حرارت ۶۰ درجه سلسیوس، زمان استخراج ۵۰ دقیقه، نسبت آب به ماده خام ۳۰ میلی لیتر بر گرم انجام شد. بالاترین راندمان استخراج (۷/۱۴±۰/۰۱٪) در قدرت ۱۵۰ وات و دوره کاری ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که با استفاده از فراصوت در مقایسه با روش سنتی استخراج می‌توان به بازده بالاتری از استخراج دست یافت. خصوصیات شیمیایی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی در شرایط بهینه نیز مورد مطالعه قرار گرفت. در طیف تبدیل فوریه مادون قرمز باندهای شاخص پلی ساکاریدها مشاهده گردید. فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکاریدها در شرایط بهینه طبق آزمون‌های دی فنیل- پیکریل- هیدرازیل (DPPH)، قدرت احیاکنندگی (RP) و قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) تعیین گردید. در نهایت، از پلی ساکاریدهای جدا شده از غلاف نخود فرنگی که یک منبع طبیعی و ارزان قیمت برای استخراج فراورده‌های با ارزش افزوده بالا محسوب می‌شود می‌توان به عنوان یک عامل ضد اکسایش طبیعی نوین در جهت تولید مواد غذایی فراسودمند استفاده نمود.

کلید واژگان: فراصوت، پلی ساکارید، غلاف نخود فرنگی، فعالیت ضد اکسایشی.

۱- مقدمه

نخود فرنگی یا نخود سبز (*Pisum sativum L.*) گیاه علفی، یکساله، پیچک دار، دارای ۳-۲ زوج برگچه و دو گوشواره دنباله برگ خیلی بزرگ و مشخص در محل اتصال برگ به ساقه می باشد. گل ها معمولاً به رنگ سفید، صورتی و گاهی ارغوانی هستند، غلاف ها فشرده و از نظر طول متفاوت بوده و دارای ۴ تا ۱۰ دانه می باشند. این دانه ها صاف یا چروکیده و به رنگ سبز، خاکستری یا متمایل به قهوه ای هستند. بر اثر کشت زیاد، نژادهای متنوعی از آن به دست آمده است که هر یک، ویژگی های معینی از نظر شکل و نوع دانه دارند. نمونه های مرغوب آن، دانه های ترد با طعم شیرین ملایم و ابعاد کوچک دارند [۱].

این گیاه بومی جنوب غربی آسیا (سوریه، عراق و ایران) و یکی از اولین محصولات کشت شده توسط انسان می باشد. این محصول عمدتاً در کشورهای نظیر کانادا، ایالات متحده آمریکا، افغانستان، اتیوپی و کشورهای اروپایی کشت می شود [۲]. طبق گزارش سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد^۱ سطح زیر کشت این گیاه در جهان در سال ۲۰۱۳ بالغ بر ۶۳۸ میلیون هکتار با تولید دانه به مقدار ۱۸/۵ میلیون تن بوده است. در سراسر جهان نخود فرنگی پس از غلاف گیری به بازار عرضه شده و مورد مصرف قرار می گیرد. در نتیجه دفع مواد زائد تولید شده پس از فراوری آن یک مشکل مهم در صنعت بشمار می آید. مطالعات صورت گرفته نشان می دهد این مواد منابع مهمی از فیبرهای خوراکی (۵۸/۶ گرم در ۱۰۰ گرم) و ترکیبات زیست فعال هستند که می توانند خواص تکنولوژیکی و یا تغذیه ای را بهبود بخشند [۳].

پلی ساکاریدها از جمله مولکول های بزرگ زیستی ضروری هستند که از بهم پیوستن مونوساکاریدها از طریق پیوندهای گلیکوزیدی تشکیل می شوند و بطور گسترده ای در منابع گوناگون نظیر محصولات کشاورزی (دانه، ساقه و برگ گیاهان)، میکروارگانیزم ها (دیواره سلولی و مایعات خارج سلولی باکتری ها، مخمرها و قارچ ها)، منابع دریایی، مایعات بدن حیوانات و پوسته سخت پوستان وجود دارند [۴ و ۵].

پلی ساکاریدهای جدا شده از منابع طبیعی فعالیت های زیستی مختلفی از جمله تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی بدن میزبان و در نتیجه اثرات ضد توموری، ضد ویروسی، ضد

عفونتی و ضد جهش زایی را به دلیل دارا بودن فعالیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی، از خود بروز می دهند. پتانسیل بالا برای بهره برداری از این بسپارهای زیستی طبیعی با طیف گسترده ای از خواص ساختاری، کاربردی و فیزیوشیمیایی، زمینه های گوناگونی را برای یافتن پلی ساکاریدها از منابع جدید و یا اصلاح شده فراهم کرده است [۶ و ۷].

پلی ساکاریدها به عنوان مولکول های بزرگ زیستی، نقش مهمی در رژیم غذایی جهت مهار رادیکال های آزاد برای پیشگیری از آسیب های اکسیداتیو ایفا می کنند. به طور کلی بسیاری از پلی- ساکاریدهای استخراج شده از گیاهان خواص ضد اکسایشی قوی به نمایش گذاشته اند و به عنوان ترکیبات ضد اکسایش جدید مورد استفاده قرار گرفته اند [۸].

همچنین میزان مهار رادیکال های آزاد بستگی زیادی به غلظت پلی ساکاریدها دارد. خواص احیاکنندگی پلی ساکاریدها به طور کلی با حضور رداکتون ها ظاهر می شود و فعالیت ضد اکسایشی با شکستن واکنش های زنجیره ای از طریق اهدا اتم هیدروژن همراه است. رداکتون ها از طریق واکنش با پیش سازهای پراکسید، از تشکیل پراکسیدها جلوگیری می کنند [۹ و ۱۰].

استخراج یکی از مهم ترین اقدامات در جهت جداسازی انواع مختلف مواد زیست فعال از میوه ها و سبزی ها می باشد [۱۱] و از طرفی، روش استخراج یکی از مهم ترین عوامل موثر بر کیفیت ترکیبات استخراج شده بشمار می آید [۱۲]. روش های متداول استخراج، معمولاً دارای عملیاتی طولانی مدت بوده که به مقدار زیادی نمونه، حلال های آلی و دمای بالا نیاز دارند. حرارت بالای ۹۵ درجه سلسیوس و طولانی مدت (بیش از ۲ ساعت) باعث کاهش فعالیت زیستی ترکیبات هدف نظیر فعالیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی می گردد و در نهایت به دلیل تخریب پلی ساکاریدها و تبدیل آن ها به قندهای آزاد، بازده استخراج کاهش می یابد [۵].

یانگ و همکاران (۲۰۱۱) به مقایسه دو روش استخراج پلی- ساکارید از برگ توت به کمک امواج فراصوت و روش سنتی آب داغ پرداختند. نتایج نشان می دهند که بازده استخراج پلی- ساکارید به کمک امواج فراصوت بیشتر از روش متداول می- باشد و همچنین استخراج به کمک امواج فراصوت به میزان کمتری از نسبت آب به ماده خام اولیه و مدت زمان استخراج نسبت به روش آب داغ نیاز دارد [۱۳].

فرکانس ۲۴ کیلوهرتز و با قطر پروب ۳ میلی‌متر مورد استفاده قرار گرفت. عصاره بدست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. محلول رویی بدست آمده از سانتریفیوژ توسط دستگاه تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء در دمای ۶۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به یک پنجم حجم اولیه تغلیظ شد. پروتئین‌زدایی به روش *Sevag* انجام گرفت. سپس ۴ برابر حجم عصاره تغلیظ شده اتانول ۹۵ درصد اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در نهایت برای به دست آوردن پلی‌ساکاریدهای خام از نیروی گریز از مرکز (۵۰۰۰ دور در دقیقه، ۲۰ دقیقه) استفاده شد و ترکیب رسوب کرده با استون و اتانول خالص شسته شد و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تا زمان رسیدن به وزن ثابت خشک گردید [۱۵]. راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها بصورت زیر محاسبه گردید:

$$\text{استخراج راندمان} (\%) = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

در این معادله، W_2 وزن پلی‌ساکارید خشک بر حسب گرم و W_1 وزن پودر خشک غلاف نخود فرنگی بر حسب گرم می‌باشد.

۲-۳- تعیین خصوصیات شیمیایی پلی-

ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

۲-۳-۱- روش‌های عمومی

محتوی قند کل به روش فنل- سولفوریک اسید با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد تعیین گردید [۱۶]. وجود قند احیاکننده به روش فهلینگ مورد بررسی قرار گرفت [۱۷]. محتوی فنلی کل به روش رنگ‌سنجی فولین- سیکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۱۸] و برحسب میلی‌گرم معادل گالیک اسید به ازاء ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بیان شد.

۲-۳-۲- طیف سنجی فرابنفش- مرئی و تبدیل فوریه

مادون قرمز (FTIR)

طیف فرابنفش برای تعیین وجود پروتئین در نمونه پلی‌ساکارید (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در دامنه ۴۰۰-۲۰۰۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس توسط دستگاه طیف سنج نوری فرابنفش- مرئی (Specord 250, ANALYTIK JENA, Germany) بدست آمد. از روش طیف سنجی برای شناسایی پیوندهای بین اتم‌های مختلف و گروه‌های عاملی استفاده می-

یان و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای به مقایسه اثر چهار روش استخراج شامل آب داغ، استخراج به کمک امواج مایکروویو، استخراج به کمک آنزیم و استخراج به کمک امواج فراصوت بر فعالیت ضد اکسایشی پلی‌ساکارید استخراج شده از دانه‌های *Amomum villosum* پرداختند. نتایج حاکی از آن است که بیشترین فعالیت ضد اکسایشی مربوط به پلی‌ساکارید استخراج شده به کمک امواج فراصوت می‌باشد. دلیل این امر به پایین‌تر بودن وزن مولکولی پلی‌ساکارید استخراج شده به کمک امواج فراصوت نسبت به سه روش دیگر مرتبط می‌باشد [۱۴].

در نهایت، هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر قدرت و دوره کاری امواج فراصوت بر راندمان استخراج و ارزیابی خواص ضد اکسایشی پلی‌ساکاریدهای موجود در غلاف نخود فرنگی می‌باشد. خصوصیات شیمیایی اولیه پلی‌ساکاریدها نیز مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی نمونه

غلاف‌های نخود فرنگی از استان زنجان در تابستان ۱۳۹۴ تهیه شد و پس از شستشو در سایه و در دمای اتاق تا رسیدن به رطوبت $8/5 \pm 0/2$ درصد خشک شدند. برای حذف برخی از قندهای آزاد، اسیدهای آمینه و برخی فنل‌ها، نمونه‌های خشک شده با اتانول ۹۵ درصد (با رعایت نسبت نمونه به حلال ۱:۲۰ گرم بر میلی‌لیتر) مخلوط شدند و در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. سپس مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید [۱۵].

۲-۲- استخراج پلی‌ساکاریدها به کمک امواج

فراصوت

برای استخراج پلی‌ساکاریدها از ۴ گرم پودر غلاف نخود فرنگی خشک شده (گذرانده شده از الک با مش ۳۰) در شرایط ثابت شامل نسبت آب به ماده خام اولیه ۱:۳۰ گرم بر میلی‌لیتر، زمان استخراج ۵۰ دقیقه و درجه حرارت استخراج ۶۰ درجه سلسیوس و سطوح مختلفی از قدرت امواج فراصوت (۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰ وات) و دوره کاری (۱۰۰٪، ۵۰-۱۰۰٪) استفاده شد. در این پژوهش، دستگاه پروب فراصوت (UP200H-Hielscher, Germany) با توان ۲۰۰ وات،

شود. برای این منظور ۲ میلی گرم از نمونه پلی ساکارید با ۳۰۰ میلی گرم پودر KBr مخلوط و به صورت قرص با ضخامت ۱ میلی متر فشرده شد و پیکها توسط دستگاه طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) در محدوده فرکانس $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ به دست آمد [۱۹].

۲-۴- اندازه گیری فعالیت ضد اکسایشی پلی - ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

۲-۴-۱- اندازه گیری فعالیت ضد اکسایشی به روش

۱،۱-دی فنیل - ۲- پیکریل - هیدرازیل (DPPH)

فعالیت مهار رادیکال ۱،۱-دی فنیل - ۲- پیکریل - هیدرازیل توسط پلی ساکاریدهای استخراج شده از غلاف نخود فرنگی طبق روش Xie و همکاران (۲۰۱۲) اندازه گیری شد [۲۰]. به طور خلاصه، محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH با استفاده از اتانول ۹۵ درصد تهیه شد. ۲ میلی لیتر از نمونه با غلظت ۰/۹ میلی گرم بر میلی لیتر با ۲ میلی لیتر از محلول DPPH مخلوط گردید. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در محیط تاریک قرار گرفت و سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج نوری فرا بنفش - مرئی اندازه گیری شد. میزان جذب پائین تر مخلوط نشان دهنده بالاتر بودن میزان مهار رادیکالها می باشد. از ویتامین ث به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. درصد توانایی میزان مهار رادیکالهای آزاد DPPH به روش زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{1 - (A_2 - A_1)}{A_0} = \text{درصد مهار رادیکالهای آزاد}$$

A_0 : میزان جذب محلول DPPH بدون اضافه کردن نمونه؛

A_1 : میزان جذب نمونه پلی ساکاریدی بدون اضافه کردن محلول DPPH؛

A_2 : میزان جذب محلول DPPH و نمونه.

۲-۴-۲- اندازه گیری میزان فعالیت ضد اکسایشی به

روش قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP^2)

این آزمون طبق روش یو و همکاران (۲۰۱۴) انجام گرفت [۶]. محلولهای مورد نیاز برای این آزمون شامل بافر استات ۳۰۰ میلی مولار با pH معادل ۳/۶، محلول ۱۰ میلی مولار TPTZ تهیه شده با اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار و محلول FeCl_3 .

۲-۴-۳- اندازه گیری میزان قدرت احیاکنندگی

۲ میلی لیتر از نمونه پلی ساکاریدی با ۲ میلی لیتر از بافر پتاسیم فسفات (۰/۲ مولار، pH ۶/۶) و ۲ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید (۱/۰ درصد وزنی - حجمی) مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. سپس ۲ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (۱۰ درصد وزنی - حجمی) بدان اضافه شد. ۲ میلی لیتر از محلول تهیه شده با ۰/۴ میلی لیتر فریک کلراید (۰/۱ درصد وزنی - حجمی) و ۲ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در محیط تاریک میزان جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر با دستگاه طیف سنج نوری قرائت گردید. میزان جذب بالاتر نشان دهنده میزان بالاتری از قدرت احیاکنندگی می باشد [۲۱].

۲-۵- تجزیه و تحلیل داده ها

در این مطالعه تغییرات راندمان استخراج و فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی در پاسخ به قدرت امواج فراصوت در چهار سطح (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ وات) و دوره کاری در دو سطح (۵۰ و ۱۰۰ درصد) در قالب طرح آزمایشی فاکتوریل بصورت کاملاً تصادفی بررسی گردید. کلیه آزمایشات حداقل با سه بار تکرار انجام شدند و تحلیل واریانس با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۶ صورت گرفت. میانگینها به روش آزمون توکی در سطح معنی داری ۰/۰۵ مقایسه گردیدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تاثیر فراصوت بر راندمان استخراج پلی

ساکارید از غلاف نخود فرنگی

در استخراج به روش سنتی، حلال داغ به آرامی از طریق دیواره های سلولی به درون بافت انتشار می یابد، بنابراین در ساختار بافت آسیب خفیفی ایجاد می شود [۲۲] و در نتیجه

راندمان استخراج می‌گردد (جدول ۱). در نتیجه قدرت ۱۵۰ وات در دوره کاری ۱۰۰ درصد به عنوان شرایط بهینه انتخاب گردید.

شی و همکاران (۲۰۱۴) با مطالعه روی تاثیر دو روش استخراج پلی‌ساکارید از *Ganoderma lucidum* به کمک امواج فراصوت و روش سنتی آب داغ دریافتند که راندمان استخراج پلی‌ساکارید به کمک امواج فراصوت تقریباً دو برابر استخراج به روش آب داغ می‌باشد. آنها دلیل این امر را کاهش و یا حذف تغییرات ساختاری و تخریب پلی‌ساکاریدها حین استخراج پلی‌ساکارید به کمک امواج فراصوت دانستند [۲۶]. در مطالعه دیگری، سماواتی و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی اثر فراسنجه‌های مختلف نظیر قدرت امواج فراصوت بر راندمان استخراج پلی‌ساکارید از برگ اسطوخودوس پرداختند. آنها در این مطالعه دریافتند که با افزایش قدرت امواج فراصوت از ۱۰۰ تا ۵۰۰ وات راندمان استخراج پلی‌ساکارید افزایش یافته ولی در محدوده قدرت ۵۰۰ تا ۷۰۰ وات راندمان استخراج به دلیل تخریب ساختار پلی‌ساکارید و تغییرات شیمیایی آن کاهش می‌یابد [۱۱].

استخراج به آرامی و با کارایی کم انجام می‌گیرد. کارایی بالاتر استخراج به کمک فراصوت در مقایسه با روش‌های متداول، عمدتاً به دلیل شکستگی دیواره سلولی و افزایش انتقال جرم از طریق پدیده حفره‌سازی می‌باشد [۱۵]. حفره‌سازی باعث تخریب دیواره سلولی، کاهش اندازه ذرات و افزایش میزان تماس بین حلال و ترکیبات هدف می‌گردد [۲۳]. قدرت‌های بالاتر امواج فراصوت، حباب‌های بیشتری نیز ایجاد می‌کند که دیواره سلولی را پاره کرده و در نتیجه انتقال جرم سریع‌تر صورت می‌گیرد. از طرفی قدرت بیش از حد امواج فراصوت باعث تجزیه پلی‌ساکاریدها و کاهش گرانیوی گردیده که منجر به کاهش راندمان استخراج پلی‌ساکارید می‌شود [۲۵ و ۲۴]. همچنین استفاده از قدرت‌های بالا باعث فرسایش دستگاه و کاهش تشکیل حفره‌سازی می‌شود. از طرفی، در استخراج به کمک امواج فراصوت، قدرت امواج فراصوت یکی از پارامترهای مهم تاثیرگذار بر هزینه‌های فرایند به ویژه در مقیاس صنعتی نیز در نظر گرفته می‌شود. نتایج به دست آمده از این پژوهش نیز نشان می‌دهد که راندمان استخراج پلی‌ساکارید با افزایش قدرت امواج فراصوت تا ۱۵۰ وات افزایش یافت. اما افزایش بیشتر قدرت امواج فراصوت (۲۰۰ وات) سبب کاهش

Table 1 Effect of ultrasonic power and duty cycle on extraction yield of polysaccharides from green pea pod

Treatment (Ultrasonic power-Duty cycle)	Extraction yield (%)
50-50	3.01±0.01 ^F
50-100	6.14±0.01 ^C
100-50	3.31±0.02 ^E
100-100	6.81±0.02 ^B
150-50	3.63±0.02 ^D
150-100	7.14±0.01 ^A
200-50	3.21±0.02 ^{EF}
200-100	6.37±0.26 ^C
Control (without ultrasound)	2.10±0.01 ^G

Different letters within the column indicate significant difference $P < 0.05$.

ساکارید بدست آمده منفی بود که نشانگر عدم وجود قندهای احیاکننده در نمونه می‌باشد. مقدار ترکیبات فنلی کل معادل 0.18 ± 0.02 میلی‌گرم معادل گالیک اسید به ازاء ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بدست آمد که نشان می‌دهد فعالیت ضد اکسایشی پلی-ساکارید تحت تاثیر ترکیبات فنلی نیست. در طیف فرابنفش، جذبی در طول موج ۲۸۰ نانومتر مشاهده نگردید که نشانگر عدم وجود پروتئین در نمونه و در نتیجه خلوص بالای پلی-ساکارید استخراج شده می‌باشد [۲۷].

۳-۲- تعیین خصوصیات شیمیایی پلی-

ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

خصوصیات شیمیایی پلی‌ساکارید استخراج شده در شرایط بهینه (قدرت فراصوت ۱۵۰ وات-دوره کاری ۱۰۰ درصد) تعیین گردید. مقدار کربوهیدرات کل در نمونه 68.2 ± 0.97 درصد بود که نشانگر مقدار بالای کربوهیدرات در نمونه بدست آمده می‌باشد. نتیجه آزمون فهلینگ برای نمونه پلی-

این باند به عنوان باند شاخص قندها محسوب می‌شود. وجود باندهای ۱۳۸۴/۳۷، ۱۲۴۵/۹۴ و $1416/15\text{cm}^{-1}$ مربوط به پیوندهای C-H، C-OH، C-O-C می‌باشند. وجود باندهای ۹۶۲/۴۸ و $876/46\text{cm}^{-1}$ نشان‌دهنده پیوندهای C-O و C-O-C می‌باشد. باند مشاهده شده در ناحیه cm^{-1} ۷۶۹/۲۹^۱ مربوط به حضور دی‌زایلوکز است. مشاهده باندهای شاخص در ناحیه ۱۲۰۰-۱۰۰۰ و 2923cm^{-1} تایید کننده وجود پلی ساکارید به عنوان ترکیب اصلی و غالب در عصاره استخراج شده است.

برای بررسی خصوصیات ساختاری پلی ساکاریدهای استخراج شده از غلاف نخود فرنگی از روش تبدیل مادون قرمز استفاده شده است. روش تبدیل فوریه مادون قرمز معمولاً در پلی- ساکاریدها برای بررسی نوع پیوندهای گلیکوزیدی، نوع مونوساکاریدها و گروه‌های عاملی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج مربوط در شکل ۱ نشان داده شده است. باند مشاهده شده در $3451/32\text{cm}^{-1}$ مربوط به پیوند O-H و باند $1108/57\text{cm}^{-1}$ مرتبط با پیوندهای C-C و C-O می‌باشند. باند مشاهده شده در $2922/54\text{cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-H بوده که

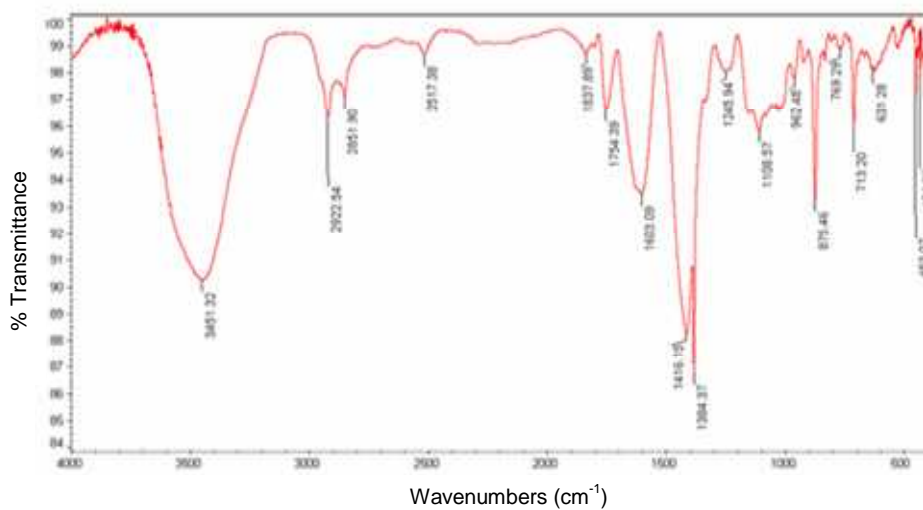


Fig 1 FTIR spectrum of green pea pod polysaccharides at optimum conditions.

توسط ترکیبات ضد اکسایش مهار کرد. به همین دلیل از این ترکیب به‌طور گسترده برای بررسی میزان فعالیت ضد اکسایشی ترکیبات طبیعی استفاده می‌شود. برای مهار رادیکال آزاد DPPH ترکیب ضد اکسایشی با انتقال یک الکترون و یا اتم هیدروژن باعث خنثی شدن رادیکال آزاد می‌گردد. خواص احیاکنندگی به‌طور کلی با حضور رداکتون‌ها اتفاق می‌افتد که می‌تواند با اهدای اتم هیدروژن یا الکترون و شکستن زنجیره رادیکال‌های آزاد باعث اعمال فعالیت ضد اکسایشی شوند. در روش قدرت احیاکنندگی، وجود ترکیبات ضد اکسایشی در نمونه با احیای اتم Fe^{3+} به Fe^{2+} عمل می‌کند و از اکسیداسیون محصول جلوگیری می‌نماید [۱۷].

۳-۳- تاثیر فراصوت بر میزان فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

پلی ساکاریدها گروهی از ترکیبات ضد اکسایش امیدبخش به- شمار می‌آیند و نتایج بسیاری از مطالعات حاکی از آن است که پلی ساکاریدها باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایش در بدن برای مهار رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون چربی‌ها می- گردند [۸]. فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکاریدها می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب شیمیایی، جرم مولکولی، ساختار، ترکیب و حتی روش خشک کردن ماده اولیه قرار گیرد [۱۰].

رادیکال آزاد DPPH یکی از رادیکال‌های پایدار با میزان جذب بالا در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌باشد که می‌توان آن را

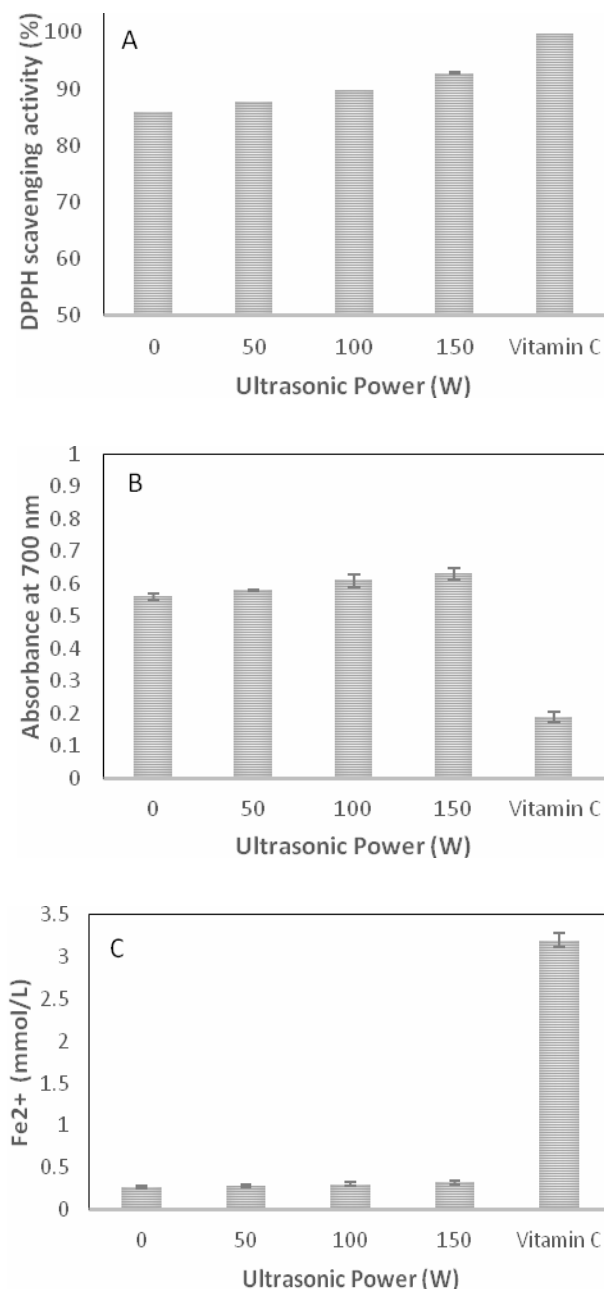


Fig 2 Antioxidant activities of green pea pod polysaccharide and ascorbic acid: (A) DPPH free radical scavenging activity; (B) reducing power and (C) Ferric reducing antioxidant power (FRAP).

علاوه بر این، برخی از عوامل از جمله ترکیب مونوساکارید، ساختار شیمیایی و ترکیب زنجیره پلی ساکارید ممکن است روی فعالیت ضد اکسایشی تاثیر داشته باشد [۲۹].

۴- نتیجه گیری

هر ساله مقدار قابل توجهی از پسماندهای حاصل از فرآوری محصولات کشاورزی بدست می آید که می توانند منبع بسیار

اندازه گیری فعالیت ضد اکسایشی به روش FRAP یک واکنش اکسیداسیون و احیاست که از طریق احیای ترکیب فریک تری پیریدیل تیرازین و تبدیل آن به فروس تری پیریدیل-تیرازین صورت می گیرد. این واکنش از طریق تغییر رنگی که در طی انجام واکنش نمایان می شود قابل شناسایی است [۲۸]. با افزایش قدرت امواج فراصوت در دوره کاری ۱۰۰ درصد میزان فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکارید استخراج شده از غلاف نخود فرنگی نیز افزایش می یابد. بالاترین میزان فعالیت ضد اکسایشی در تمامی آزمون های انجام گرفته مربوط به قدرت ۱۵۰ وات امواج فراصوت می باشد. تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین $(P < 0.05)$ بین نتایج فعالیت های ضد اکسایشی در قدرت های مختلف فراصوت وجود دارد. میزان فعالیت ضد اکسایشی آزمون DPPH برای قدرت های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ وات به ترتیب ۸۶/۰۸۷، ۸۷/۸۹۳، ۸۹/۷۹ و ۹۲/۸۴ درصد (شکل ۲ الف)، میزان قدرت احیاکنندگی به ترتیب ۰/۵۶، ۰/۵۸، ۰/۶۱ و ۰/۶۳ می باشد (شکل ۲ ب). همچنین میزان فعالیت ضد اکسایشی به روش FRAP برای قدرت های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ وات به ترتیب ۰/۲۶، ۰/۲۸، ۰/۳۰ و ۰/۳۲ به دست آمد (شکل ۲ ج). براساس نتایج ارائه شده در شکل ۲ میزان فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکارید استخراج شده از غلاف نخود فرنگی در تمامی روش های مورد مطالعه کمتر از فعالیت ضد اکسایشی ویتامین ث بود.

نتایج تحقیقات انجام گرفته روی *Phellinus linteus* [۲۹]، *Porphyra yezoensis* و *Inonotus obliquus* [۳۰] حاکی از آن است که افزایش قدرت امواج فراصوت باعث افزایش فعالیت ضد اکسایشی می شود. این امر می تواند به دلیل کاهش وزن مولکولی با افزایش قدرت امواج فراصوت باشد.

کاهش وزن مولکولی و کوچک شدن ترکیب مولکولی باعث افزایش تعداد گروه های هیدروکسیل شده که در نتیجه توانایی هیدروژن دهی پلی ساکارید افزایش یافته و در پی آن فعالیت ضد اکسایشی افزایش می یابد.

- [7] Chen, S., Chen, H., Tian, J., Wang, J., Wang, Y. and Xing, L. 2014. Enzymolysis-ultrasonic assisted extraction, chemical characteristics and bioactivities of polysaccharides from corn silk. *Carbohydrate Polymers*, 101: 332–341.
- [8] Zeng, W-C., Zhang, Z. and Jia, L.R. 2014. Antioxidant activity and characterization of antioxidant polysaccharides from pine needle (*Cedrus deodara*). *Carbohydrate Polymers*, 108: 58–64.
- [9] Sila, A., Bayar, N., Ghazala, I., Bougatef, A., Ellouz-Ghorbel, R. and Ellouz-Chaabouni, S. 2014. Water-soluble polysaccharides from agro-industrial by-products: Functional and biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69: 236–243.
- [10] Fan, L., Li, J., Deng, K. and Ai, L. 2012. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 87: 1849–1854.
- [11] Samavati, V. and Manoochehrizade, A. 2013. *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* leaf: New source of polysaccharide and its anti-oxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, 98: 199–207.
- [12] Prakash Marana, J. and Priya, B. 2014. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70: 530–536.
- [13] Ying, Z., Han, X., and Li, J. 2011. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 127: 1273–1279.
- [14] Yan, Y., Li, X., Wan, M., Chen, J., Li, S. and Cao, M. 2015. Effect of extraction methods on property and bioactivity of water-soluble polysaccharides from *Amomum villosum*. *Carbohydrate Polymers*, 117: 632–635.
- [15] Wen, L., Lin, L., You, L., Yang, B., Jiang, G. and Zhao, M. 2011. Ultrasound-assisted extraction and structural identification of polysaccharides from *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth) H. Hara. *Carbohydrate Polymers*, 85: 541–547.
- مهمی از ترکیبات با ارزش باشند. فرآوری این پسماندها علاوه بر تولید ترکیبات با ارزش افزوده بالاتر به دفع ضایعات حاصل از کارخانجات فرآوری محصولات کشاورزی کمک شایانی نموده و مشکلات زیست محیطی را به حداقل می‌رساند. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که غلاف نخود فرنگی یک منبع طبیعی و ارزان قیمت برای استخراج فراورده‌های با ارزش افزوده بالا نظیر پلی ساکارید با فعالیت ضد اکسایشی می‌باشد که می‌توان آن را با استفاده از روش استخراج به کمک فراصوت در مقایسه با روش سنتی با عملکرد بالاتری استحصال نمود. به همین دلیل، پیشنهاد می‌شود که در زمینه استفاده از آن به عنوان یک عامل ضد اکسایش در جهت تولید مواد غذایی فراسودمند در ایران نیز تحقیق و پژوهش شود.

۵- منابع

- [1] Zargari, A. 1991. *Medicinal plants* (2nd Ed.). Tehran: Tehran University publications.
- [2] Kumari, J., Dikshit, H. K., Singh, B., and Singh, D. 2015. Combining ability and character association of agronomic and biochemical traits in pea (*Pisum sativum* L.). *Scientia Horticulturae*, 181: 26–33.
- [3] Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.-J., Zapata-Revilla, M.-A and Tenorio-Sanz, M.-D. 2010. Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 1467-1470.
- [4] Zong, A., Cao, H. and Wang, F. 2012. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90: 1395–1410.
- [5] Shi, M., Yang, Y., Hu, X. and Zhang, Z. 2014. Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue. *Food Chemistry*, 155: 50–56.
- [6] You, Q., Yin, X., Zhang, S. and Jiang, Z. 2014. Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. *Carbohydrate Polymers*, 99: 1–10.

- [24] Li, J.-w., Ding, S.-d., and Ding, X.-l. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. *jinsixiaozao*. *Journal of Food Engineering*, 80: 176–183.
- [25] Wang, Y., Liu, Y. and Hu, Y. 2014. Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 111: 324–332.
- [26] Shi, M., Yang, Y., Hu, X. and Zhang, Z. 2014. Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue. *Food Chemistry*, 155: 50–56.
- [27] Zhao, L., Dong, Y., Chen, G. and Hua, Q. 2010. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 80: 783–789.
- [28] Irshad, M., Zafaryab, M., Singh, M. and Rizvi, M. A. 2012. Comparative analysis of the antioxidant activity of cassia fistula extracts. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 1-7.
- [29] Yan, J.-K., Wang, Y.-Y., Ma, H.-L. and Wang, Z.-B. 2016. Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29: 251–257.
- [30] Fu, L., Chen, H., Dong, P., Zhang, X., and Zhang, A. 2010. Effects of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Science*, 75: 322-327.
- [31] Zhou, C., Yu, X., Zhang, Y., He, R. and Ma, H. 2012. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Udea. *Carbohydrate Polymers*, 87: 2046–2051.
- [16] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- [17] Zhang, Z., Lv, G., He, W., Shi, L., Pan, H., and Fan, L. 2013. Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers*, 98: 1524–1531.
- [18] Li, J.E., Nie, S.P., Xie, M.Y. and Li, C. 2014. Isolation and partial characterization of a neutral polysaccharide from *mosla chinensis maxim*. Cv. *Jiangxiangru* and its antioxidant and immunomodulatory activities. *Journal of Functional Foods*, 6: 410-418.
- [19] Chen, Y., Luo, H., Gao, A. and Zhu, M. 2011. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from litchi (*Litchi chinensis Sonn.*) seed by response surface methodology and their structural characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12: 305–309.
- [20] Xie, Jian-Hua, Shen, M-Y., Xie, M-Y., Nie, S-P., Chen, Y. and Chang, L. 2012. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) *Ilijinskaja* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 89: 177–184.
- [21] Ma, C.-w., Feng, M., Zhai, X., Hua, M., You, L. and Luo, W. 2013. Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44: 886–894.
- [22] Ying, Z., Han, X. and Li, J. 2011. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 127: 1273–1279.
- [23] Prakash Maran, J., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Vigna Nivetha, C. and Dinesh, R. 2013. Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 92: 604–611.

Effect of ultrasound on extraction of polysaccharides from green pea pod

Jalili Safaryan, M. ¹, Ganjloo, A. ^{2*}, Bimakr, M. ², Zarringhalami, S. ²

1. M.Sc in Food Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

(Received: 95/05/29 Accepted: 95/07/06)

Polysaccharides are biomacromolecules which have an important role in the human diet to scavenge free radicals preventing oxidative damages. In this study, the effects of ultrasonic power (50- 100- 150- 200 W) and duty cycle (50- 100%) at frequency of 24 KHz on extraction yield of polysaccharides from green pea pod as a by-product of food processing premises were studied. Polysaccharide extraction was performed at extraction temperature of 60°C, extraction time of 50 min and water to raw material ratio of 30:1 mL:g. The maximum extraction yield (7.14±0.01%) was obtained with ultrasonic power of 150 W and duty cycle of 100%. This finding indicated that ultrasound treatment in comparison with traditional methods can enhance the extraction yield. The green pea pod polysaccharides have been analyzed in order to identify a variety of chemical properties. FT-IR spectrum demonstrated obvious characteristic peaks of polysaccharides. Antioxidant activity of green pea pod polysaccharides was determined by DPPH, RP and FRAP assays. Finally, polysaccharides extracted from green pea pod as a natural and low cost source for extraction of value added products can be used as a novel and natural antioxidant agent for functional food production.

Keywords: Ultrasound, Polysaccharide, Green pea pod, Antioxidant activity

*Corresponding Author E-Mail Address: aganjloo@znu.ac.ir