بهینه‌سازی فرآیند استخراج پلی ساکارید از میوه کدو حلوایی و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

محمود چهارلنگ[1*]، مقداد اسکندری[2]، فرشید اسکندری[3]

۱- کارشناس تولید شکر کشت و صنعت امام خمینی (ره) و مدرس دانشگاه علمی کاربردی آذین شوشتر
۲- کارشناس امور استاندارد اداره کل استاندارد استان خوزستان
۳- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی

(تاریخ دریافت: ۹۵ /۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۰٤)

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی تأثیر عوامل مختلف (دمای استخراج ۹۰ – ۷۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۵–۱ساعت و نسبت آب به ماده خشک (۵۰–۳۰ میلی‌لیتر بر گرم) در استخراج پلی ساکارید از میوه کدو حلوایی(*Cucurbitamoschata*) با استفاده ازآب داغ انجام گرفته است. از روش سطح پاسخ نیز جهت یافتن شرایط بهینه فرآیند وتأثیر متقابل فاکتورها به کمک طرح Box–Behnken با سه متغیر در سه سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی استفاده گردید. ویژگی مورد بررسی شامل تعیین ترکیب شیمیایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانیو قابلیت جذب آب و روغن توسط پلی ساکارید استخراجی بود. نتایج نشان داد که کلیه متغیرهای مورد بررسی باعث افزایش بازده استخراج پلی ساکارید گردید. در این میان، عامل زمان استخراج دارای بیشترین و عامل نسبت آب به ماده خام دارای کمترین تأثیر بودند. بهینه‌سازی بازده استخراج پلیساکارید حاکی از آن بود که ترکیبی از نسبت آب به ماده خام ۳۲/۹٦ میلی‌لیتر بر گرم، زمان ٤/۹۳ ساعت و دمای استخراج ۸۸/٤٤ درجه سانتی‌گراد باعث بیشترین بازده (۵/۰۹٪) استخراج گردید. نتایج حاصل از بررسی‌های شیمیایی نشان داد که پلی ساکارید استخراجی دارای ظرفیت بالایی برای جذب رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال‌هایDPPH و هیدروکسیل می‌باشد.

کلید واژگان: کدو حلوایی، استخراج پلی ساکارید، روش سطح پاسخ، بهینه‌سازی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی.

* مسئول مکاتبات: m.chaharlang56@yahoo.com

۱- مقدمه

کدو حلوایی اولین بار در مکزیک در حدود ۱٤۰۰ سال قبل از میلاد مسیح کاشته شد و یکی از گیاهان جالیزی به شمار می‌آمد.کدو حلوایی با نام لاتین Butternut squashو نام علمی *Cucurbitamoschata*میوه یک گیاه علفیدارای ساقه‌های بلند و خزنده و برگ‌های پهن از خانواده *Cucurbitaceae* است. کدو حلوایی شیرین و به رنگزردیانارنجی است وعموماً یکطرف آن بزرگ‌تر و پهن تر از طرف دیگر است و برای مصرف خوراکی کاشته می‌شود. کدو حلوایی بسیار درشت، بیضوی شکل یا کروی و بیشتر اوقات دنبلی شکل است و وزن آن به ٤۰ کیلوگرم هم می‌رسد که نوع بیضوی آن به خاطر استفاده از تخم آن کاشته می‌شود [۱].

کدو حلوایی غنی از ویتامین‌های A، C وE می‌باشد. منبع خوبی از ترکیبات پلی ساکاریدی، فلاوونوئیدهای پلی‌فنولیک مثل بتاکاروتن و آلفاکاروتن، کریپتوگزانتین، لوتئین و زئاگزانتین است. سرشار از ویتامین‌هایB کمپلکس، مثل فولیت‌ها، نیاسین، ویتامین‌های B6، تیامین و اسید پانتوتنیک است. حاوی املاح معدنی مثل مس، کلسیم، پتاسیم و فسفر می‌باشد. دانه‌های کدو حلوایی، بهترین منبع تأمین فیبر و اسیدهای چرب اشباع نشده و مفید برای قلب هستند [۲].

پلی ساکاریدها جمله ترکیبات مهم و مفید در بافت‌های گیاهی هستند که دارای ویژگی‌های تغذیه‌ای مناسبی مانند ضد سرطان، جاذب رادیکال‌های آزاد، افزایش تولید هیدروکسی پرولین وگلیکوزآمینوگلیکان (در درمان بیماری‌های مفاصل) می‌باشد [۳]. تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع پلی ساکارید از بافت‌های گیاهی جدا شده است. از این پلیساکاریدها می‌توان به بتا-دی-گلوکانها، هتروپلیساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها اشاره کرد. بتا-دی-گلوکانها با پیوند (1→3)- β (D-glycopyranosyl)گلیکوپیرانوزیل به کربن ٦ متصل شده اند. هتروپلی ساکاریدها از مونوساکاریدهایی چون زایلوز، مانوز، گالاکتوز، گلوکز، آرابینوز، اورنیک اسیدوغیره تشکیل یافته‌اند. پلیساکارید موجود دربرخی منابع گیاهیکه دارای پیوند بتا دی-گلوکان (β 3→1) است باعث تقویت سیستم ایمنیمی‌شود. پلیساکاریدها خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و محافظت‌کنندگی در برابر اشعه را دارا می‌باشند. پلیساکاریدهای جدا شده از بافت‌های گیاهی باعث کاهش قند خون در موش‌های آزمایشگاهی به وسیله آزاد ساختن انسولین از سلول‌های β پانکراس می‌شوند [٤-۷].

در این تحقیق با توجه به عدم وجود اطلاعات و مستندات کافی در خصوص نحوه تأثیرعوامل مختلف در فرایند استخراج پلی ساکارید از کدو حلوایی، بهینه سازیشرایط مختلف استخراجپلی ساکارید مورد بررسی قرار گرفت. از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه‌ی فاکتورهای مورد بررسی، استفاده شد. به علاوه ترکیب شیمیایی، توانایی جذب آب و روغن و ویژگی جذب رادیکال‌های آزاد توسط پلی ساکارید استخراج شده بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مصرفی

کدو حلوایی از بازار محلی در اهواز در پاییز سال ۱۳۹۳خریداری گردید. اتانول ۹٦۰ از شرکت رازی تهیه گردید و با آب برای تولید اتانول ٦۰ و ۸۰ درصد رقیق گردید.معرف‌های شیمیایی نیز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- استخراج پلی ساکارید

ابتدا به منظور جداسازی تمامی ناخالصی‌ها و مواد خارجی، کدوها به صورت دستی پوست‌گیری و تمیز و سپس با آب به خوبی شسته شدند. سپس با آب مقطر، آبکشی گردیدند و در آون تحت خلا در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند تا علاوه بر آنزیم بری، خشک نیز شوند. استخراج پلی ساکارید از بخش خوراکی میوه کدو حلوایی به کمک روش سون و تامکینسون انجام گرفت [۸]. به طور خلاصه، ۲۰۰ گرم میوه کدوی خشک شده در یک مخلوط کن خرد شد و به پودر نرمی تبدیل شد. سپس جهت حذف مواد رنگی، چربی و الیگوساکاریدها، ۳ بار با اتانول ٦۰٪ با دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت مخلوط و شستشو شدند.

بخش‌های خوراکی خشک شده و خردشده به کمک سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از مخلوط الکلی جداسازی شد. سپس فرآیند استخراج پلی ساکارید از ۲۰ گرم نمونه میوه خشک شده با آب داغ در نسبت‌های مختلف آب به ماده خام (۳۰ تا ۵۰میلی‌لیتر بر گرم)، دماهای مختلف (۷۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های مختلف استخراج (۱ تا

۵ساعت) انجام گردید. از اتانول ۸۰٪ جهت تکمیل فرآیند استخراج و رسوب‌دهی پلی ساکارید حاصل استفاده شد. پلی ساکارید رسوب کرده در آون تحت خلا به کمک هوای گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و توزین شد و بازده استحصال پلی ساکارید به کمک رابطه زیر تعیین گردید:

بازده استخراج ٪ = (وزن میوه خشک/وزن پلی ساکارید حاصل)×100

۲-۳- تعیین ترکیب شیمیایی پلی ساکارید استخراج شده

میزان رطوبت، خاکسترکل و محلول در آب پلی ساکارید استخراج شده از بخش خوراکی میوه کدو حلوایی طبق استاندارد AOAC تعیین گردید[۹]. میزان ازت موجود در پلی ساکارید استخراج شده به کمک روش کلدالاندازه‌گیری شد و برای تعیین میزان پروتئین نیز از ضریب ٦/۲۵ استفاده گردید.

۲-٤- تعیین ظرفیت نگهداری آب و روغن

ظرفیت نگه داری آب (WHC)[1]و ظرفیت جذب چربی (LAC)[2] پلی ساکارید استخراج شده از کدو حلوایی طبق روش کاروالیو و همکاران اندازه‌گیری شد[۱۰]. در این روش برای اندازه‌گیریWHC ، ۳۰ میلی‌لیترآب مقطر به یک گرم نمونه اضافه شده و خوب همزده شد. مخلوط مورد نظر یک ساعت در دمای اتاق نگه‌داری و سپس در g ۱۲۰۰۰به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته و باقیمانده وزن شد. ظرفیت نگهداری آب،به صورت نسبت وزن آب به وزن نمونه گزارش می‌شود. برای اندازه‌گیریLAC، ۳ گرم نمونه به ۱۸ میلی‌لیترروغن آفتابگردان اضافه شده و به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق نگه‌داری شد. مخلوط مورد نظردرg ۱۵۰۰به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده، روغن اضافه دور ریخته شد و سپس باقیمانده وزن شد. LAC، به عنوان نسبت وزن روغن به وزن نمونه گزارش می‌شود.

۲-۵- سنجش قدرت پلی‌ساکارید در مهار رادیکال DPPH

ساکارید استخراج شده

با روش اصلاح شده توسط تیان و همکاران انجام گرفت [۱۱].۵۰ میکرولیتر از محلول پلی‌ساکارید در غلظت‌های مختلف (۳۰۰-۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) به لوله محتوی ۵ میلی‌لیتر محلول DPPH (۰/۱ میلی‌مول در اتانول) اضافه شد. مخلوط حاصل، بعد از هم‌زنی زیاد و شدید، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگه داشته شد و سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدلGenesys، ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد. مخلوط مشابهی طبق گفته‌های بالا حاوی BHT و بدون پلی‌ساکارید به عنوان نمونه شاهد تهیه گردید. میزان جذب کمتر مخلوط واکنش نشان دهنده فعالیت بیشتر جذب رادیکال‌های آزاد می‌باشد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید:

مهار رادیکال آزاد (٪) = $(A_0-A_1/A_0)\times 100$

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

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

۲-٦- سنجش قدرت پلی‌ساکارید در مهار رادیکال هیدروکسیل (OH)

توانایی و قابلیت جذب رادیکال‌های هیدروکسیل پلی‌ساکارید استخراج شده به کمک روش ارائه شده توسط ژانگو همکاران ارزیابی شد [۱۲]. نمونه پلی‌ساکاریدها در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در غلظت‌های متفاوت ۵۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر حل شدند. محلول نمونه با ۱ میلی‌لیتر سولفات آهن (۱/۵ مولار) و۰/۳ میلی‌لیتر سدیم سالیسیلات (۲۰ مولار) مخلوطشد. سپس محلول حاصل با ۰/۷ میلی‌لیتر از H_2O_2 (٦ مولار) مخلوط گردید. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. حداکثر جذب در ٥٦٢ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط مشابهی حاوی اسید آسکوربیک و بدون پلی ساکارید به عنوان نمونه شاهد تهیه شد.درصد مهار رادیکال هیدروکسیل به کمک رابطه زیر تعیین گردید:

فعالیت مهار کنندگی = ۱ - $(A_{sample}/A_{control})\times 100$

1. Water holding capacity
2. Lipid absorption capacity

A_{sample}: میزان جذب مخلوط پلی‌ساکارید در طولموج ۵۶۲ نانومتر

$A_{control}$: میزان جذب مخلوط بدون پلی‌ساکارید در طول موج ۵۶۲ نانومتر

۲-۷- طرح آزمایشات و تجزیه و تحلیل آماری

بهینه کردن شرایط استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ انجام می‌شود و به صورت یک مدل چند جمله ای درجه دوم بیان می‌شود.

معادله شماره ۱:

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

که در آن Yمتغیر پاسخ، β_{ij}،β_{ii}،β_i،β_0 به ترتیب ضریب ثابت، ضریب خطی و ضریب درجه دو و ضریب اثر متقابل هستند. X_i و X_j متغیرهای مستقل هستند [۱۳].

در این تحقیق از طرح باکس بنکن (*BBD*)، با سه فاکتور در سه سطح برای بررسی تأثیر متغیرهای مختلف بر بازده استخراج و بهینه‌سازی فرایند استخراج پلی ساکارید از بخش خوراکی کدو حلوایی (*Cucurbitamoschata*) استفاده شده است. متغیرهای مختلف و سطوح آن ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

Table 1 Independent variables levels

Independent variables	Factor levels		
	-1	0	+1
Water to raw material ratio (mL/g)	30	40	50
Extraction time (h)	1	3	5
Extraction temperature (^oC)	70	80	90

۳- نتایج بحث

۳-۱- بهینه سازی استخراج و بررسی کارآمدی مدل

طبق جدول ۲، مقایسه مقادیر تجربی اندازه‌گیری شده با مقادیر پیشبینی شده، تطابق این اعداد را نشان می‌دهند. این موضوع همبستگی بسیار خوب بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش بینی شده توسط مدل با روش آماری را نشان می‌دهد. همانطور که از جدول ۲ مشخص است، در بین تیمارهای مختلف مورد بررسی، تیمار با نسبت آب به ماده خام ۴۰ میلی‌لیتر بر گرم، زمان استخراج ۵ ساعتو دمای استخراج 80^oC به بیشترین بازده استخراج ۵/۰۰٪ منتهی شد.

Table 2 Box-Behnken experimental design with experimental and predicted values

Run	Water to raw material ratio (ml/g)	Extraction time (h)	Extraction temperature (oC)	Measured response (yield)	Predicted response
1	40	3	80	2.50	2.43
2	40	5	90	4.70	4.65
3	40	1	90	3.00	3.05
4	40	5	80	5.00	5.08
5	40	3	80	2.40	2.39
6	50	5	80	4.90	4.86
7	50	3	90	3.10	3.14
8	30	3	70	4.90	4.91
9	30	3	90	3.60	3.69
10	40	1	70	4.50	4.46
11	50	1	80	4.30	4.34
12	40	5	70	4.70	4.61
13	40	3	80	4.30	4.40
14	40	3	80	4.50	4.40
15	30	5	80	4.50	4.40
16	40	3	80	4.30	4.40
17	50	3	70	4.40	4.40

به منظور حصول مدل برای پیش بینی پاسخ (بازده استخراج) رابطه‌های خطی و چند جمله‌ای درجه دوم بر داده‌های بهدست آمده از آزمایش‌ها بررسی گردیدند. آنالیز رگرسیون و جدول ANOVA برای تعیین مدل و همچنین معنی‌داری آن از نظر آماری مورد استفاده قرار گرفت (جدول۳). در پژوهش حاضر R^2 برای بازده استخراج ۰/۹۸۳ بدست آمد که بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده است.

مطابق جدول۳، میزان بازده استخراج پلی ساکارید از میوه کدو حلوایی بـا درجـه اول دمای استخراج و نسبت آب به ماده خام و زمان استخراج در ارتباط بود و همگی تأثیر معناداری بر بازده استخراج داشـتند. بررسی اثـر مربعـات نیـز حاکی از آن بود که زمان استخراج به شکل درجه دوم بر میزان بازده پلی ساکارید استخراج شده از میوه کدو حلواییاثردارد. بنابراین، بـه نظـرمی‌رسد که از بین متغیرهای مـستقل (دمـای استخراج، زمان استخراج و نسبت آب به ماده خام)،زمان استخراج تاثیر بیشتری بر میزان پاسخ داشتهباشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که اثر مربعات نسبت آب به ماده خام و دمـای استخراج بر میزان بازده استخراج پلی ساکارید، معنادار ($P>0.05$) نیست. در بین اثرات متقابل نیز، اثر متقابل زمان استخراج و دمای استخراج بر بازده استخراج پلی ساکارید معنی‌دار نیست ($P>0.05$). با استفاده از روش آماری سطح پاسخ، معادله‌پذیل بـه عنوان مدل رگرسیونی برای پیشبینی میـزان بازده استخراج پلی ساکارید بهدست آمد که ارتباط تجربی بین میـزان بازده پلی ساکارید اسـتخراجی و متغیرهـای آزمـایش را نشان می‌دهد.

معادله شماره ۲:

$$Y\ (\%) = ٤/٤٠ + ١/٠٦X_1 + ٠/٢٦X_2 + ٠/٢٠X_3 - ٠/١٧X_1X_3 - ٠/١٢X_2X_3 + ٠/٥٢X_1^2$$

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the extraction yield.

Source	Sum of squares	DF	Mean square	*F*-value	*p*-value
Model	11.332	9	1.259	113.725	< 0.0001
A-Extraction time	9.031	1	9.031	815.726	< 0.0001
B-Extraction temperature	0.551	1	0.551	49.790	0.0002
C-Water to raw material ratio	0.320	1	0.320	28.903	0.0010
AB	0.010	1	0.010	0.903	0.3736
AC	0.123	1	0.123	11.065	0.0127
BC	0.062	1	0.062	5.645	0.0492
A^2	1.161	1	1.161	104.822	< 0.0001
B^2	0.024	1	0.024	2.139	0.1870
C^2	0.011	1	0.011	0.951	0.3620
Residual	0.078	7	0.011		
Lack of Fit	0.038	3	0.013	1.250	0.4028
Pure Error	0.040	4	0.010		
Total	11.41	16			
R^2			0.983		
Adj.R2			0.974		

۳-۲- تأثیر متغیرهای مستقل بر بازده استخراج پلی ساکارید از میوه کدو حلوایی

۳-۲-۱- تأثیر زمان استخراج

شکل ۱ تأثیر زمان استخراج در سطوح مختلف را بر بازده استخراج پلی‌ساکارید از میوه کدو حلوایی نشان می‌دهد، در حالی‌که دو متغیر دیگر یعنی دمای استخراج و نسبت آب به ماده خام به ترتیب در نقطه مرکزی (۸۰ درجه سانتی‌گراد، ٤٠ میلی‌لیتر بر گرم) ثابت بودند. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش زمان از ۱ به ۵ ساعت بازده استخراج از ۱/۸۹ به ٤/۹۱ درصد افزایش می‌یابد. این ممکن است به دلیل زمان مورد نیاز در معرض قرار گرفتن پلی ساکاریدها در محیط آبی باشد. هنگامی که مایع به ماده خام خشک نفوذ می‌کند، پلی ساکاریدها حل می‌شوند و به طور متوالی از ماده خام انتشار می‌یابند [١٤].

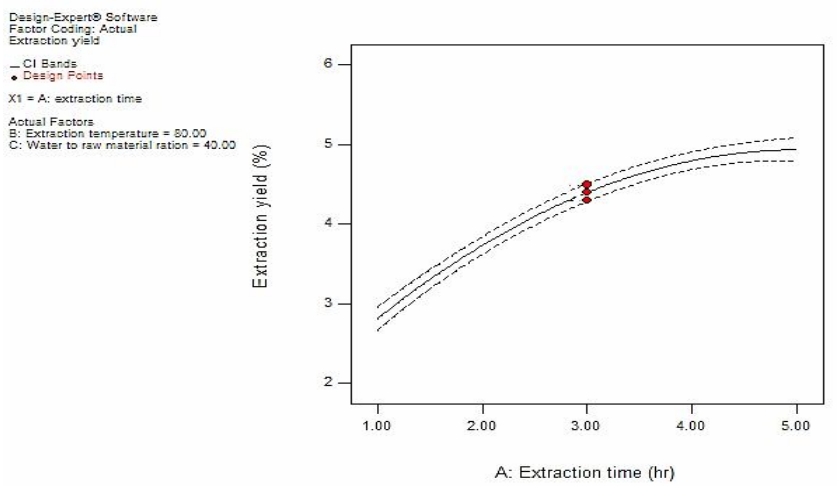

Fig 1 Effect of extraction time on the extraction yield of polysaccharide.

۳-۲-۲- تأثیر دمای استخراج

شکل ۲ تأثیر دماهای مختلف استخراجرا بر بازده استخراج پلی‌ساکارید از میوه کدو حلوایی نشان می‌دهد. در این حالت زمان استخراج و نسبت آب به ماده خام به ترتیب در نقطه مرکزی (۳ ساعت، ٤٠ میلی‌لیتر بر گرم) ثابت نگه داشته شدند. همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود بازده استخراج پلی‌ساکارید به طور خطی با افزایش دما افزایش می‌یابد و به ٤/٧٧ ٪ می‌رسد. دلیل افزایش بازده با افزایش دما این است که دمای بالا سبب کاهشگرانروی، تسریع حرکت مولکولی و افزایش ضریب هدایت حلال به داخل ماده جامد می‌شود؛ در نتیجه سبب افزایش حلالیت و انتشار موادگیاهی مورد هدف به داخل محلول و افزایش بازده استخراج می‌شود. اگرچه ثابت شده است افزایش دما، محدودیت‌هایی هم دارد و علاوه بر اینکه هزینه استخراج افزایش می‌یابد اثر معکوس در بازده دارد و می‌تواند سبب کاهش بازده شود زیرا ترکیبات مورد هدف تجزیه شده، ناخالصی و مواد نامحلول وارد عصاره می‌شود [١٤]. در پژوهشی که توسط وانگ و همکاران برروی هیدروکلوئیدهای یک نوع گیاه دارویی*ترامیتیس*صورت گرفت افزایش دما از ٤٠ به ٦٠ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش بازده استخراج شد [١٥]. افزایش دما سبب افزایش انتشار هیدروکلوئیدها و افزایش حلالیت آنها می‌شود که با نتایج بدست آمده در این تحقیق و سایر پژوهش‌های انجام شده مطابقت داشت.

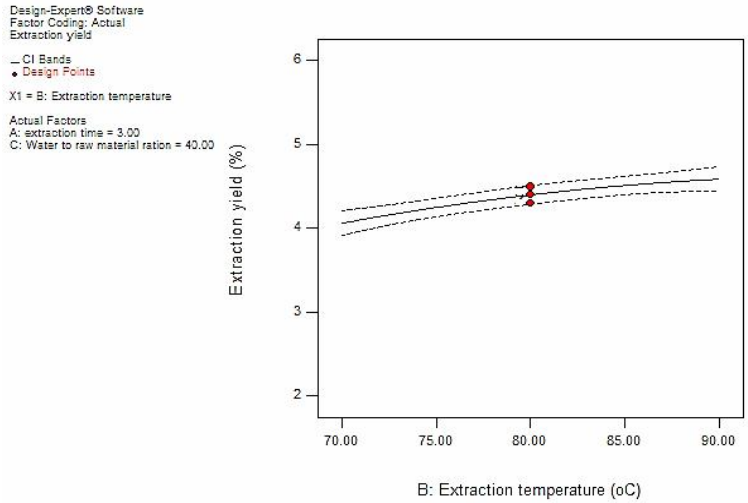

Fig 2 Effect of extraction temperature on the extraction yield of polysaccharide.

۳-۲-۳- اثر نسبت حلال به ماده خام بر بازده استخراج پلی‌ساکارید

کمیت حلال از فاکتورهای با اهمیت برای بازده استخراج می‌باشد. در این پژوهشنسبت‌های مختلف از آب به ماده خام بر میزان بازده استخراج پلی‌ساکارید از میوه کدو حلوایی بررسی گردید در حالی‌که دو متغیر دیگر یعنی زمان استخراج و دمای استخراج به ترتیب در نقطه مرکزی (۳ ساعت و $80^{o}C$) ثابت نگه داشته شدند (شکل ۳). با توجه به شکل۳می‌توانتیجه

گرفت که با افزایش نسبت آب به ماده خام از ۳۰ به ۵۰ میلی‌لیتر/ گرم، بازده استخراج از ٤/١١ به٤/٦٢٪ افزایشیافت. دلیل افزایش ممکن است، افزایش انتشار حلال به داخل دیواره سلولی و خروج بیشتر پلی‌ساکارید باشد. اگر نسبت آب به مواد خام کم باشد همه مواد خام نمی‌توانند به طور کامل استخراج شوند و از طرفی زیادی نسبت آب به ماده خام هم هزینه بر می‌باشد بنابراین یک نسبت مناسب از آب و ماده خام را باید انتخاب کرد. ژانگ و همکاران اثر نسبت‌های ۱۰ تا ٦۰ میلی‌لیتر/گرم را برای استخراج پلی‌ساکارید از پوست انار مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند با افزایش اینسبت، بازده استخراج به دلیل انتشار حلال به دیواره سلولی و انحلالپلی‌ساکاریدها افزایش یافت که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد [۱۲].

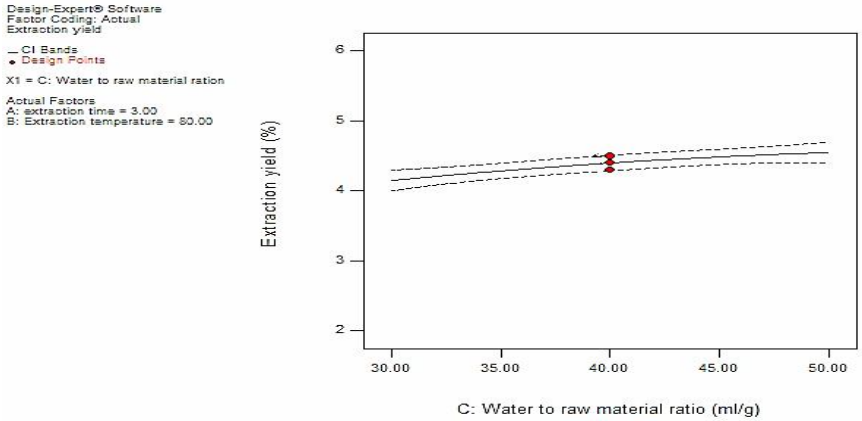

Fig 3 Effect of water to raw material ratio on the extraction yield of polysaccharide.

۳-۲-٤- بررسی اثر متقابل متغیرهای مورد بررسی بر بازده استخراج پلی‌ساکارید

نمودارهای سه‌بعدی سطح پاسخ در شکل ٤ اثرات متقابل نسبت آب به ماده خام و زمان استخراج را در حالی که دمای استخراج در نقطه مرکزی ۸۰°C دقیقه ثابت باشد، نشان می‌دهد. می‌توان چنین استنباط کرد که افزایش هماهنگ نسبت آب به ماده خام و زمان استخراج در سطوح مورد بررسی بر بازده استخراج پلی ساکارید از میوه کدو حلوایی اثری افزایشی دارد و افزایش نسبت آب به ماده خام و زمان استخراج، به ترتیب تا ۵۰ میلی‌لیتر بر گرم و ۵ساعت، بازده استخراج پلی ساکارید را تا ٤/٩٢ درصد افزایش داده است.

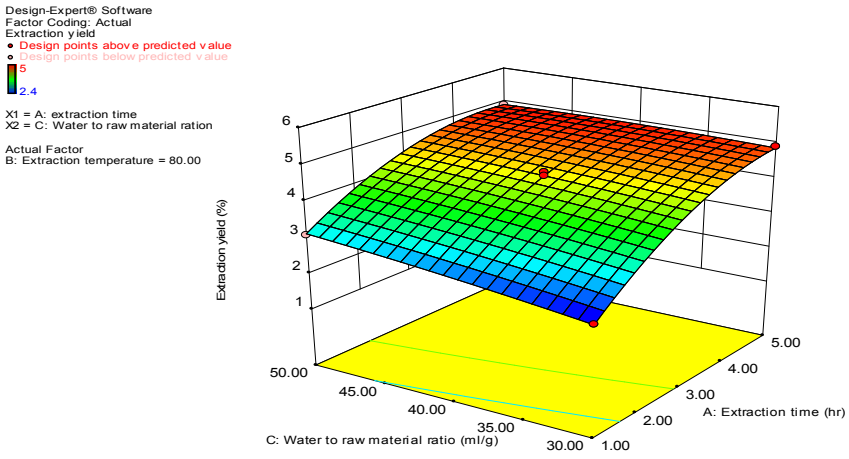

Fig 4 Effect of extraction time and water to raw material ratio on the extraction yield of polysaccharide.

۳-۳- بهینه یابی فرآیند استخراج پلی‌ساکارید

شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج پلی‌ساکارید از میوه کدو حلوایی با استفاده از روش بهینه‌سازی عددی با نرم افزار Design Expert نسخه ۸ بررسی گردید. بدین منظور در

ابتدا شرایط بهینه توسط نرم افزار انتخاب گردید. شرایط بهینه شامل نسبت آب به ماده خام ۳۲/۹۶ میلی‌لیتر بر گرم، زمان استخراج ٤/۹۳ ساعت و دمای استخراج ۸۸/٤٤ درجه سانتی‌گراد باعث بیشترین بازده (۵/۰۹٪) استخراج گردید. سپس برای بررسی درستی و صحت نتایج حاصل از مدل در شرایط آزمایشگاه،آزمون در شرایط بهینه مدل با ۳ تکرار انجام شد.بازده تجربی ۰/۱۸ ± ٤/۹۸ درصد و بازده پیش بینی شده ۵/۰۹ شد. همانطور که مشاهده می‌شود اختلاف قابل توجهی بین نتیجه پیش بینی شده توسط مدل و نتیجه به دست آمده از کار آزمایشگاهی مشاهده نمی‌شود.

۳-٤- بررسی ترکیب شیمیایی پلی ساکارید استخراجی از میوه کدو حلوایی

در جدول ۵نتایج حاصل از آنالیز ترکیب شیمیایی پلی ساکارید استخراجی از میوه کدو حلوایی نشان داده شده است. همانطور که از جدول پیداست، میزان رطوبت پلی ساکارید استخراج شده ۱۰/۳۷٪بود. همچنین مقدار پروتئین بدست آمده از پلی ساکارید استخراجی ٤/۳۱٪ بود. خاکستر کل پلی ساکارید استخراجی ۳/۱۲٪ بود که از این مقدار، ۲/۰٤٪ خاکستر محلول می‌باشد. این مقدار در مقایسه با صمغ‌های عربی و زانتان (۱/۸٪ و ۱/۷٪) بیشتر و در مقایسه با صمغ گوار (۹٪) کمتر بود [۱٦]. همانطور که در جدول (۵) نشان داده شده است مقدار کربوهیدرات کل در پلی ساکارید استخراجی(۷٦/۰۵٪) بود که نشان‌دهنده این است که درجه خلوص پلی ساکارید استخراجی نسبتاً بالا می‌باشد.

Table 5 Chemical composition of extracted polysaccharide

Parameter	% (dry basis)
Moisture	10.37 ± 0.32
Nitrogen	0.69 ± 0.05
Crude protein (N× 6.25)	4.31 ± 0.09
Water-soluble ash	2.18 ± 0.06
Total ash	3.09 ± 0.07
Total sugar	75.36 ± 0.61

۳-۵- تعیین ظرفیت نگهداری آب و روغن

برای بررسی قابلیت کاربرد تکنولوژیکی پلی ساکاریدهای جداشده ازمیوه کدو حلوایی در بافت‌های غذایی و اثر آن بر پایداری بافت، ویژگی توانایی نگهداری آب (WHC) و توانایی جذب روغن (LAC) اندازه‌گیری شده است. همانطور که مشاهده می‌شود توانایی نگهداری آب در مورد پلی ساکاریدهای کدو حلوایی ۰/۰۲ ±۷/۸۸ گرم آب به گرم پلی ساکارید بود. WHCبه توانایی شبکه پلی ساکارید برای جذب و حفظ آب بر می‌گردد. این موضوع هم به لحاظ تکنولوژیکی و هم از نظر فیزیولوژیکی بسیار حائز اهمیت است. ازلحاظ تکنولوژیکی ترکیباتی که توانایی حفظ و جذب آب دارند می‌توانند منجر به افزایش گرانروی، پایداری بافت و جلوگیری از پس دادن آب شوند. مقدارWHC پلی ساکارید کدو حلوایی قابل مقایسه با توانایی نگهداری آب فیبرهای رژیمی استخراج شده از لیمو، گریپ فروت، پرتقال و سیب است که توسط فیگورولا و همکاران مطالعه شده است[۱۷]. ترکیباتی باتوانایی نگهداری آب بالا می‌توانند با افزایش گرانروی مواد غذایی دردستگاه گوارش، افزایش حجم مدفوع و دفعات تخلیه بیشتر به کاهش سرعت جذب مواد کمک کنند. این خصوصیت در کنترل وزن و بهبود وضعیت سلامتی بخصوص برای پیشگیری از بروز بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت مؤثر است.

ظرفیت جذب روغن (LAC) به توانایی شبکه پلی ساکارید برای جذب روغن برمی‌گردد. ترکیباتی باتوانایی جذب روغن بالا به لحاظ تکنولوژیکی می‌توانند برای پایداری بافت امولسیون‌های پر چرب استفاده شوند. هم‌چنین به لحاظ فیزیولوژیکی باتوجه به داشتن توانایی جذب چربی می‌توانند به کاهش جذب چربی غذای خورده شده به خون کمک کنند. این خصوصیت نیز برای فیبرهای رژیمی از منابع مختلف مورد مطالعه قرارگرفته است به طوریکه مقدار جذب چربی پلی ساکارید استخراج شده از میوه کدو حلوایی (۰/۰۹±۲/۵۵ گرم روغن به گرم پلی ساکارید) قابل مقایسه با جذب چربی فیبرهای رژیمی مطالعه شده مانند سبوس برنج (۲/۸۹)، پلی ساکارید استخراج شده از میوه گیاه *کوردیا میکسا*(۲/۰٤) ویافیبرهای استخراج شده از منابع دریایی (۳/۲٦)است و حتی مقدار آن از جذب چربی فیبرهای مطالعه شده برخی میوه‌ها بیشترمی‌باشد. موادی با ظرفیت جذب چربی بالا می‌توانند جذب چربی رژیمی را در وسعت معدوی-روده ای تحت تأثیر

قرار دهند و جذب چربی را از غذاهای فروبرده شده کاهش دهد.بنابراین قابلیت کنترل چربی خون و وزن بدن را دارا هستند. بنابراین این مواد با چنین قابلیت‌هایی جهت تولید مواد غذایی سالم‌تر و جهت اصلاح بافت غذاهای فرموله شده بسیار مناسب هستند [۱۸]. در واقع یکی از مکانیسم‌های اثر بخشی پلی ساکاریدها در کاهش چربی خون، کنترل وزن و بهبود وضعیت سلامتی به خاطرداشتن توانایی جذب آب و جذب چربیاست.

۳-٦- تعیین توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل (OH)

در بین انواع اکسیژن‌های واکنش‌دهنده، رادیکال هیدروکسیل فعال‌ترین رادیکال آزاد است کهبا شروع واکنش‌هایزنجیره‌ای رادیکال آزاد به همه مولکول‌های زیستی حمله می‌کند. با توجه به شکل۵، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلی ساکارید استخراج شده از میوه کدو حلوایی با توجه به توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل در غلظت‌هایppm ۳۰۰-۵۰ بررسی گردید. همانطور که از شکل ۵ پیداست، توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل توسط پلی ساکارید استخراج شده از میوه کدو حلوایی وابسته به غلظت می‌باشد. همچنین، میزان مهارشدن رادیکال‌های هیدروکسیل توسط آنتی اکسیدان طبیعی اسید آسکوربیک در غلظتppm ۳۰۰، (۸۰٪) می‌باشد که این میزان برای پلی ساکارید استخراج شده از میوه کدو حلوایی در غلظت مشابه، ٤۲ ٪ است.

درکلیه آزمون‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، با افزایش غلظت پلی ساکارید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد که دلیل آن ورود مقدار بیشتر ترکیبات فنلی به محیط واکنش است به این معنا که افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. توانایی مهارکنندگی فنل‌ها به دلیل گروه‌های هیدروکسیل (OH) و گروه‌های قابل تعویض متوکسی ($-OCH_3$) در ملکول‌هاست [۱۵]. اثرات آنتی اکسیدانی ترکیبات پلی فنلی در محیط آزمایشگاهی و زیستی ثابت شده است ولی میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی آنها با توجه به ساختار آنها متفاوت می‌باشد. با افزایش غلظت ترکیبات فنلی و افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل در محیط واکنش، احتمال هیدروژن دهی به رادیکال‌های آزاد بیشتر شده وفعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد [۱۹].

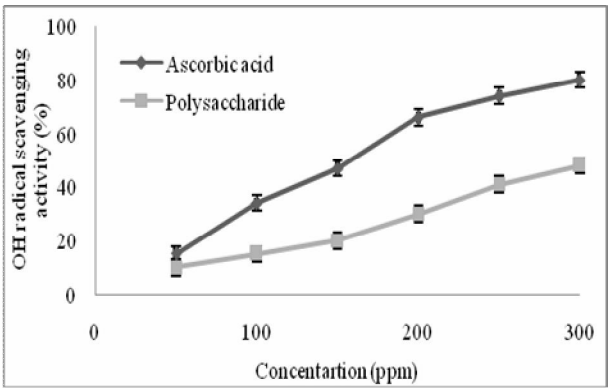

Fig 5OH radical scavenging activity

۳-۷- تعیین توانایی جذب رادیکال DPPH

DPPHیک رادیکال آزاد است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر از خود نشان می‌دهد. هر ترکیبی که بتواند یک هیدروژن به آن بدهد از حالت رادیکالی خارج شده و به فرم پایدار تبدیل می‌شود و این مساله با تغییر رنگ محلول DPPH و تغییر جذب آن مشخص می‌شود. تأثیر غلظت در توانایی آنتی‌اکسیدانی از طریق آزمایش فعالیت جذب رادیکال‌های DPPH بررسی و کنترل شد (شکل٦). همان طوری که در شکل ٦ نشان داده شده است، فعالیت جذب رادیکال DPPH با افزایش غلظت پلی ساکارید افزایش می‌یابد. نتایج نشان دادند که پلی ساکارید استخراج شده از میوه کدو حلوایی ظرفیت آنتی اکسیدان قابل توجهی داشته و توانسته بر روی رادیکال‌های آزاد DPPH به ویژه در غلظت‌های بالاتأثیر بگذارد. از اسید آسکوربیک به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی و نمونه شاهد استفاده شده است. با توجه به شکل ٦، جذب رادیکال آزاد DPPH توسط اسید آسکوربیک بیشتر تر از پلی ساکارید به دست آمده در این تحقیق است. مکانیسم احتمالی که توسط آن به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می‌کند ممکن است به نیروی الکترون دهندگی شان به رادیکال‌های آزاد نسبت داده شود که از این طریق واکنش زنجیره رادیکال پایان می‌یابد[۲۰]. میزان جذب رادیکال DPPH توسط اسید آسکوربیک ۸۰٪ می‌باشد در حالی که این میزان برای پلی ساکارید بدست آمده ٤۳٪ است. این نتایج مطابق نتایج پژوهش سوندهاراراجان و همکاران است که نشان دادند فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره گیاه تابع غلظت آن است و با افزایش غلظت عصاره، افزایش می‌یابد[۲۱].

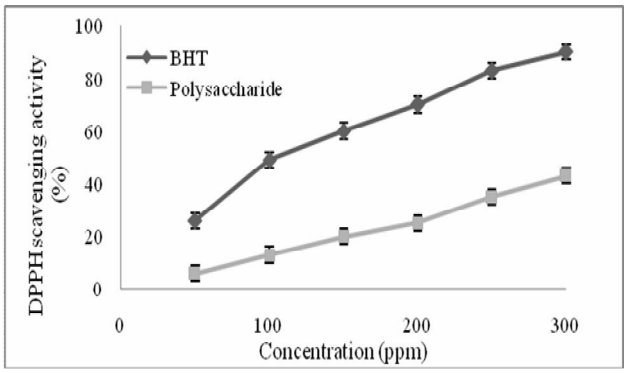

Fig 6DPPH radical scavenging activity

٤- نتیجه گیری

استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از میوه کدو حلوایی به کمک آب داغ انجام گرفت. در بین متغیرهای مورد بررسی، زمان استخراج دارای بیشترین تأثیر و نسبت آب به ماده خام دارای کمترین تأثیر افزایشی بر بازده استخراج پلی ساکارید از میوه کدو حلوایی بودند. نتایج نشان داد که در شرایط بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم، مقادیر بازده استخراج تجربی و پیش بینی شده دارای تفاوت معنی‌داری نبوده و مدل توانسته استنتایج تجربی را به خوبی پیش بینی کند.پلی ساکارید استخراج شده از میوه کدو حلوایی به کمک آب داغدارای توانایی بالایی برای جذب رادیکال‌های آزاد و ویژگی آنتی‌اکسیدانی بود. میزان پروتئین و خلوص پلی ساکارید استخراجی نسبتاً بالا بود.ظرفیت جذب آب و روغن پلی ساکارید استخراجی نیزنسبتاً بالا بود که حاکی از قابلیت‌های تکنولوژیک و کاربردی آن در صنعت می‌باشد.

٥- منابع

[1] Wang, S. Y., Huang, W. C., Liu, C. C., Wang, M. F., Ho, C. S., Huang, W. P., ... & Huang, C. C. (2012). Pumpkin (Cucurbitamoschata) fruit extract improves physical fatigue and exercise performance in mice. *Molecules*, *17*(10), 11864-11876.

[2] Zolfaghari, B., &Yekdaneh, A. (2010). Recent advances in the extraction of plant ingredients. *Journal of Herbal Drugs*, *1*, 51-55.

[3] Pan, Y., Dong, S., Hao, Y., Zhou, Y., Ren, X., Wang, J., ...& Chu, T. (2010). Ultrasonic-assisted extraction process of crude polysaccharides from Yunzhi mushroom and its effect on hydroxyproline and glycosaminoglycan levels.*Carbohydrate Polymers*, *81*(1), 93-96.

[4] Badalyan, S. M., Gharibyan, N. G., &Kocharyan, A. E. (2007). Perspectives in the Usage of Bioactive Substances of Medicinal Mushrooms in Pharmaceutical and Cosmetic Industries.*INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICINAL MUSHROOMS*, *9*(3/4), 275.

[5] Zhang, H. N., & Lin, Z. B. (2004). Hypoglycemic effect of Ganodermalucidum polysaccharides.*ActaPharmacologicaSinica*, *25*(2), 191-195.

[6]-Bashi, D. S., Mortazavi, S. A., Rezaei, K., Rajaei, A., &Karimkhani, M. M. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from yarrow (Achilleabeibrestinii) by response surface methodology.*Food Science and Biotechnology*, *21*(4), 1005-1011.

[7] Song, Y., Du, B., Zhou, T., Han, B., Yu, F., Yang, R., ...& Li, Q. (2011). Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary structural analysis of polysaccharides from defatted peanut (Arachishypogaea) cakes.*Carbohydrate research*, *346*(2), 305-310.

[8] Sun, R., & Tomkinson, J. (2002). Comparative study of lignins isolated by alkali and ultrasound-assisted alkali extractions from wheat straw. *UltrasonicsSonochemistry*, *9*(2), 85-93.

[9] Helrick, K. (1990). *Official methods of analysis*.AOAC.

[10] Carvalho, A. F. U., Portela, M. C. C., Sousa, M. B., Martins, F. S., Rocha, F. C., Farias, D. F., &Feitosa, J. P. A. (2009). Physiological and physico-chemical characterization of dietary fibre from the green seaweed Ulva fasciataDelile.*Brazilian Journal of Biology*, *69*(3), 969-977.

[11] Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C., & Lo, Y. M. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (Agaricusbisporus). *Carbohydrate Polymers*, *88*(2), 522-529.

[12] Zhang, Z., Lv, G., He, W., Shi, L., Pan, H., & Fan, L. (2013). Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from Flammulinavelutipes. *Carbohydrate polymers*, *98*(2), 1524-1531.

[13] Samavati, V., &Skandari, F. (2014). Recovery, chemical and rheological characterization of gum from Assyrian pulm.*International journal of biological macromolecules*, *67*, 172-179.

[14] Samavati, V. (2013). Central composite rotatable design for investigation of microwave-assisted extraction of okra pod hydrocolloid.*International journal of biological macromolecules*, *61*, 142-149.

[15] Wang, Y., Liu, Y., & Hu, Y. (2014). Optimization of polysaccharides extraction from Trametesrobiniophila and its antioxidant activities.*Carbohydrate polymers*, *111*, 324-332.

[16] Cui, W., &Mazza, G. (1996). Physicochemical characteristics of flaxseed gum. *Food Research International*, *29*(3-4), 397-402.

[17] Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., &Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, *91*(3), 395-401.

[18] Tadayoni, M., Sheikh-Zeinoddin, M., &Soleimanian-Zad, S. (2015). Isolation of bioactive polysaccharide from acorn and evaluation of its functional properties.*International journal of biological macromolecules*, *72*, 179-184.

[19] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., &Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.*LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.

[20] Lai, F., Wen, Q., Li, L., Wu, H., & Li, X. (2010). Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (Vignaradiata L.) hull with ultrasonic assisted treatment. *Carbohydrate Polymers*, *81*(2), 323-329.

[21] Sowndhararajan, K., & Kang, S. C. (2013). Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of Bauhinia vahlii Wight &Arn. *Saudi journal of biological sciences*, *20*(4), 319-325.

Optimization of polysaccharide extraction from *Cucurbitamoschata* and evaluation of physicochemical properties

Chaharlang, M.[1*], Eskandari, M.[2], Eskandari, F.[3]

1. Expert of sugar production at Imam agro-industry and lecturer of Applied Sciences University, AzinShushtar Branch
2. Standard organization, Khuzestan, Iran
3. M.Sc. graduate, Food Science & Engineering

(Received: 2017/03/15 Accepted:2017/09/26)

The aim of present study was to investigate the effects ofdifferent factors including extraction temperature (70-90°C), extraction time (1-5 h) and water to raw material ratio (30-50 ml/g) on the polysaccharide extraction efficiency from the*Cucurbitamoschata*. The response surface methodology was usedto determine the optimal condition and the interactional effect of all factors by Box-behnkendesignwiththree variables at three levels and 5 replications atthe central point. Antioxidant activity, water holding capacity, and lipid absorption capacity of extracted polysaccharide was evaluated. The results showed that increasing of the all independent parameters increased the yield of polysaccharide extraction. Among these factors, the extraction time had the maximum and water to raw material ratio had the minimum effects. Optimization of polysaccharide extraction yield indicated that combination of the water to raw material ratio of 32.96 ml/g, extraction time 4.93 h and extraction temperature of 88.44°C resulted in maximum extraction yield (5.09%). The results of antioxidant activity tests showed that the extracted polysaccharide had high capacity to absorb the free radicals and can be used as a suitable antioxidant compound in food and drug industries.

Key words: *Cucurbitamoschata*, polysaccharide extraction, Response surface methodology, optimization, Physicochemical properties.

* Corresponding Author E-Mail Address: m.chaharlang56@yahoo.com