

استخراج، خالص سازی و بهینه سازی صمغ دانه بارهنگ با پیش تیمار فراصوت

رسول نیکنام^۱، علی ایاسه^{۲*}، بابک قنبرزاده^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

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

۳- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۳۰)

چکیده

صمغ‌ها پلی‌ساکاریدهایی هستند که بیشتر از منابع گیاهی و میکروبی استحصال می‌شوند و کاربرد وسیعی در صنایع غذایی و دارویی به عنوان قوام دهنده، ژل دهنده، پایدار کننده و امولسیفایر دارند. دانه بارهنگ با نام علمی *Plantago major L.* از خانواده *Plantaginaceae* می‌باشد که به طور سنتی به عنوان ضد عفونت، بهبود دهنده سیستم ایمنی و آنتی اکسیدان و هم چنین برای بهبود زخم استفاده می‌شود. در این مطالعه از روش سطح پاسخ (RSM) و طرح آزمایشی Box-Behnken برای بهینه سازی استخراج صمغ دانه بارهنگ با پیش تیمار فراصوت استفاده شد. بهینه سازی استخراج صمغ شامل ۲ مرحله اساسی بود: مرحله فراصوت با متغیرهای توان (۲۰۰ تا ۴۰۰ وات)، دما (۲۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۱۵ تا ۳۰ دقیقه) و مرحله استخراج با متغیرهای نسبت دانه به آب مقطر (۱ به ۱۰ تا ۱ به ۲۰)، دما (۵۵ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۲۰ تا ۴۰ دقیقه). نتایج حاصل از بهینه سازی نشان داد که توان ۴۰۰ وات، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ دقیقه، نسبت دانه به آب مقطر ۱ به ۲۰، دمای استخراج ۷۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴۰ دقیقه به عنوان حالت‌های بهینه برای استخراج این صمغ با پیش تیمار فراصوت بودند. بعد از استخراج، خالص سازی و بهینه سازی صمغ دانه بارهنگ، مقادیر رطوبت، خاکستر، پروتئین و کربوهیدرات آن اندازه گیری شد که براساس نتایج حاصل شده، ۶/۲۰٪ رطوبت، ۳/۲۳٪ خاکستر، ۲/۰۳٪ پروتئین و ۸۸/۴۷٪ کربوهیدرات به دست آمد. آنالیز مونوساکاریدهای صمغ دانه بارهنگ با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد که مونوساکاریدهای غالب در این صمغ، آرابینوز با ۵۶/۷۲٪ و رامنوز با ۲۱/۸۴٪ بود.

کلید واژگان: استخراج صمغ، پیش تیمار فراصوت، دانه بارهنگ، روش سطح پاسخ

* مسئول مکاتبات: ayaseh@tabrizu.ac.ir

۱- مقدمه

هیدروکلوئیدها مجموعه‌ای از بیوپلیمرهای با وزن مولکولی بالا هستند که به عنوان قوام دهنده، ژل کننده، امولسیفایر، پایدار کننده و جایگزین چربی در فرمولاسیون محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. کلمه هیدروکلوئید تمامی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از منابع گیاهی، میکروبی و هم چنین صمغ‌های مشتق شده از ترشحات گیاهان را شامل می‌شود [۱].

معرفی منابع جدید هیدروکلوئیدها با ویژگی‌های عملکردی مناسب به یکی از دغدغه‌های محققان در پژوهش‌های اخیر تبدیل شده است که دلیل آن افزایش تقاضا برای استفاده از این منابع در محصولات می‌باشد که در این بین، منابع هیدروکلوئیدی حاصل از دانه‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که دلیل آن می‌تواند قیمت مناسب، در دسترس بودن و خصوصیات عملگرایی مناسب آن‌ها باشد. دانه‌های گیاهان از منابع قدیمی و سنتی صمغ‌ها هستند. اکثر دانه‌ها مقداری نشاسته به عنوان ذخیره غذایی جهت استفاده جوانه گیاه دارند اما بسیاری از آن‌ها حاوی پلیمرهای پلی‌ساکاریدی دیگر با خواص کارکردی مشابه صمغ‌ها می‌باشند که آن‌ها را تبدیل به منابع مفیدی جهت استحصال هیدروکلوئید-های تجاری کرده است [۲].

صمغ‌ها پلی‌ساکاریدهایی هستند که بیشتر از منابع گیاهی و میکروبی استحصال می‌شوند و هرکدام دارای ساختار متفاوت و ویژگی‌های مختلف می‌باشند [۳]. از منابع مهم هیدروکلوئیدی که از دانه‌های گیاهی استحصال می‌شوند می‌توان به مواردی هم چون دانه خرنوب، دانه به، دانه ریحان و دانه شاهی اشاره کرد [۴].

دانه بارهنگ با نام علمی *Plantago major* L. از خانواده *Plantaginaceae* می‌باشد که معمولاً دارای ارتفاع ۱۵ سانتی-متر است که این مقدار می‌تواند بسته به منطقه رشد متفاوت باشد. تولید دانه‌های زیاد از ویژگی‌های اصلی این گیاه می‌باشد. به طور سنتی، از این گیاه به عنوان بهبود دهنده زخم، آنتی اکسیدان و تقویت کننده سیستم ایمنی استفاده می‌شود. براساس تحقیقات پیشین، پلی‌ساکارید استخراج شده به روش آبی این دانه دارای مونوساکاریدهای زایلوز، آرابینوز، گالاکتورونیک اسید، گالاکتوز، گلوکز و رامنوز می‌باشد. از جمله دانه‌های هم خانواده دانه

بارهنگ، دانه اسفرزه می‌باشد که دارای ساکاریدهای مانوز، آرابینوز، گالاکتوز، رامنوز، زایلوز و گلوکز می‌باشد [۵].

روش معمول استخراج صمغ از دانه‌های گیاهی، استخراج با آب می‌باشد اما امروزه روش‌های جدیدی هم چون استخراج با پیش تیمار فراصوت و مایکروویو نیز مورد استفاده قرار گرفته است. استخراج صمغ با پیش تیمار فراصوت به دلیل سادگی، هزینه کم، دمای پایین و حفظ ویژگی‌های بیولوژیکی ماده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در نتیجه می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای روش‌های معمول استخراج باشد [۶].

روش سطح پاسخ^۱ (RSM) یک روش مؤثر برای بهینه سازی فرآیندهای استخراج می‌باشد که در آن تأثیر متغیرهای مختلف بر یک یا چند ویژگی مانند راندمان بررسی می‌گردد. از این روش برای بهینه سازی استخراج پلی‌ساکاریدهای مختلف از دانه‌های گیاهی استفاده می‌شود [۷]. بررسی‌های اولیه نشان داد که سه متغیر توان، دما و زمان در مرحله فراصوت و سه متغیر نسبت دانه به آب مقطر، دمای استخراج و زمان استخراج در مرحله اصلی استخراج از عوامل اصلی مؤثر در راندمان استخراج صمغ از دانه بارهنگ می‌باشند. در نتیجه، برای رسیدن به بالاترین راندمان استخراج نیاز است که بهینه سازی فرآیند صورت گیرد [۸].

براساس مطالعات انجام شده، استخراج صمغ با پیش تیمار فراصوت برای دانه‌هایی مانند به [۹] و ریحان [۱۰] صورت گرفته است اما هیچ تحقیقی بر روی استخراج صمغ دانه بارهنگ با پیش تیمار فراصوت در منابع مورد بررسی مشاهده نگردید. هدف اصلی این پژوهش، بررسی فرآیند استخراج با پیش تیمار فراصوت و بهینه سازی این فرآیند در جهت رسیدن به بالاترین راندمان استخراج می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده سازی نمونه

دانه‌های بارهنگ استفاده شده در این پژوهش از بازار محلی تبریز خریداری و پس از بسته بندی در ظروف پلاستیکی، تا زمان استفاده در جای خشک و خنک نگهداری گردید. تمام مواد

1. Response Surface Methodology

۲-۳- طرح آزمایشی

از روش سطح پاسخ (RSM) برای بهینه سازی فرآیند استخراج صمغ دانه بارهنگ با پیش تیمار فراصوت استفاده شد. در این روش از طرح Box-Behnken جهت ارزیابی تأثیرات متغیر-های اصلی آزمایش استفاده گردید که شامل ۲ مرحله بهینه سازی با ۳ متغیر با ۳ سطح کد گذاری شده (۱، ۰ و -۱) و ۱۷ آزمون برای هر مرحله بود که در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. برای مرحله فراصوت، ۳ متغیر توان (A) (۲۰۰ تا ۴۰۰ وات)، دما (B) (۲۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد) و زمان (C) (۱۵ تا ۳۰ دقیقه) و برای مرحله استخراج، ۳ متغیر نسبت دانه به آب مقطر (A) (۱ تا ۱۰ به ۱۰ تا ۲۰)، دمای استخراج (B) (۵۵ تا ۷۵ درجه سانتی گراد) و زمان استخراج (C) (۲۰ تا ۴۰ دقیقه) به عنوان متغیرهای مؤثر در پاسخ (راندمان استخراج) در نظر گرفته شدند که این مقادیر براساس نتایج آزمایش‌های اولیه و منابع مورد مطالعه پیش از شروع بهینه سازی و تولید صمغ انتخاب گردید. معادله رگرسیونی درجه ۲ جهت تعیین ارتباط بین متغیرهای مستقل و پاسخ (راندمان) و پیش بینی شرایط بهینه به صورت زیر به دست آمد:

معادله (۱)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

که Y نشان دهنده پاسخ پیش بینی شده (راندمان استخراج)، β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب نشان دهنده ضرایب رگرسیونی برای عرض از مبدأ، معادله خطی، معادله درجه ۲ و اثر متقابل بین متغیرها و X_i و X_j نشان دهنده متغیرهای مستقل کد گذاری شده می‌باشد.

برای مقایسه مقادیر به دست آمده در آزمون و مقادیر پیش بینی شده از نرم افزار Design Expert 10.0 استفاده شد. هم چنین، برای تعیین اعتبار نتایج به دست آمده از پارامتر R^2 ، $adj-R^2$ و پارامترهای دیگر استفاده شد و همه ۱۷ آزمون انجام شده برای هر مرحله، ۳ بار تکرار شد و میانگین این ۳ تکرار به عنوان راندمان حاصل از آزمون در نظر گرفته شد و با مقادیر پیش بینی شده برای راندمان توسط نرم افزار مقایسه گردید.

شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق دارای درجه آنالیتیکال بودند.

۲-۲- استخراج صمغ دانه بارهنگ با پیش تیمار

فراصوت

جهت تمیز کردن دانه‌های بارهنگ، این دانه‌ها به صورت کامل در آب مقطر غوطه ور گشته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد هم زده شدند. سپس دانه‌های تمیز شده، به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر جهت فرآیند سونیکاسیون مخلوط شدند. برای اعمال پیش تیمار فراصوت، از دستگاه فراصوت پروب (فاپن، ایران) با سه متغیر توان (۲۰۰ تا ۴۰۰ وات)، دما (۲۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد) و زمان (۱۵ تا ۳۰ دقیقه) استفاده شد. سپس، محلول آب و دانه، فیلترشده و دانه‌ها با آب مقطر ۵۰ درجه سانتی گراد مخلوط شدند. سه متغیر نسبت دانه به آب مقطر (۱:۱۰ تا ۱:۲۰)، دمای استخراج (۵۵ تا ۷۵ درجه سانتی گراد) و زمان استخراج (۲۰ تا ۴۰ دقیقه) به عنوان متغیرهای مؤثر در مرحله استخراج در نظر گرفته شدند. پس از مخلوط شدن کامل دانه‌ها و آب مقطر در دما و زمان مشخص، از یک اکستراکتور مجهز به صفحه چرخنده (پارس خزر، ایران) جهت جدا سازی موسیلاژ از دانه‌ها استفاده و سپس عمل فیلتراسیون صورت گرفت. در مرحله بعد، از اتانول ۹۶٪ به نسبت ۱ به ۳ برای رسوب دادن صمغ استخراج شده استفاده شد. صمغ رسوب داده شده با پارچه کتانی فیلتر و سپس دو بار با اتانول ۷۰٪ و دو بار با اتانول ۹۶٪ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در هر بار شستشو داده شد. این فرآیند شست و شو جهت حذف کامل باقی مانده‌های احتمالی دانه‌ها، بهبود هرچه بیشتر رنگ صمغ تولیدی و خروج مواد معدنی صورت گرفت. بعد از شستشو، صمغ استحصال شده به مدت ۱۶ ساعت در آون (فن آزما گستر، ایران) با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. صمغ خشک شده، آسیاب و پس از بسته بندی در جای خشک و خنک جهت آزمایشات بعدی نگهداری شد [۸].

ادامه یافت. افت وزنی پس از سرد شدن نمونه در دسیکاتور محاسبه و میزان خاکستر بر مبنای وزن خشک تعیین گردید [۱۳].

۷-۲- اندازه گیری پروتئین صمغ

مقدار پروتئین نمونه های صمغ دانه بارهنگ با استفاده از روش کلدال و دستگاه میکروکلدال اتوماتیک (FOSS، دانمارک) محاسبه گردید [۱۳].

۸-۲- اندازه گیری pH صمغ

برای اندازه گیری pH، ۱ گرم پودر صمغ با ۱۰۰ سی سی آب مقطر مخلوط شد و این اختلاط تا زمان حل شدن کامل پودر صمغ ادامه یافت. محلول حاصل فیلتر شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد تا به صورت کامل هیدراته گردد. در نهایت، pH نمونه ها با استفاده از pH متر (MC 25C، چین) کالیبره شده محاسبه گردید [۱۴].

۹-۲- آنالیز مونوساکاریدهای صمغ

از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)^۲ مجهز به شناساگر پراکنش نور (Shimadzo سری ۲۰، ژاپن) برای آنالیز مونوساکاریدهای صمغ دانه بارهنگ استفاده گردید. ابتدا ۵۰۰ میلی گرم از نمونه صمغ توزین و با آب مقطر رقیق و محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد، عمل خنثی سازی صورت گرفت و ۱/۵ میلی لیتر از محلول از فیلتر با مش ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و در نهایت به دستگاه کروماتوگرافی تزریق گردید. شرایط دستگاه کروماتوگرافی مورد استفاده: ستون HRC-NH₂ (قطر: ۴/۶ میلی متر و طول ۲۵۰ میلی متر)، سرعت جریان، ۲ میلی لیتر در دقیقه، دما، ۳۰ درجه سانتی گراد و فاز متحرک عبارت بود از: مخلوط ۷۹ به ۲۱ استونیتریل - آب. برای انجام این آزمون از نتایج استاندارد قندهای گلوکز، فروکتوز، زایلوز، رامنوز، گالاکتوز، آرابینوز، مانوز و گلوکورونیک اسید استفاده گردید [۱۵].

Table 1 Independent variables and their levels used in the response surface design of ultrasound stage

Independent variables	Factor Level		
	-1	0	1
Seed:Water ratio	10	15	20
Temperature	55	65	75
Time	20	30	40

Table 2 Independent variables and their levels used in the response surface design of extraction stage

Independent variables	Factor Level		
	-1	0	1
Power	200	300	400
Temperature	25	32.5	40
Time	15	22.5	30

۴-۲- اندازه گیری راندمان صمغ تولیدی

راندمان صمغ دانه بارهنگ تولید شده از نسبت وزن پودر صمغ خشک به دست آمده به وزن دانه اولیه استفاده شده محاسبه گردید [۱۲].

۵-۲- آزمون رطوبت

میزان رطوبت صمغ دانه بارهنگ استخراج شده براساس استاندارد AOAC (۲۰۰۵) با خشک کردن نمونه ها در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت به دست آمد. نمونه ها پس از خروج از آون در دسیکاتور سرد شده و میزان رطوبت بر مبنای افت وزن محاسبه گردید [۱۳].

۶-۲- آزمون خاکستر

برای اندازه گیری خاکستر، ۲ گرم پودر صمغ در کروزه ای با وزن مشخص ریخته و در کوره (گدازه ساز، ایران) با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. حرارت دادن تا سفید شدن کامل نمونه

2. High Performance Liquid Chromatography

۲-۱۰- آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج از طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. آنالیز واریانس (ANOVA) داده‌ها با نرم افزار SPSS 21.0 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بهینه سازی فرآیند استخراج با پیش تیمار

فراصوت

۳-۱-۱- آنالیز مدل رگرسیونی

هدف اصلی بهینه سازی فرآیند استخراج صمغ دانه بارهنگ با پیش تیمار فراصوت، رسیدن به بالاترین راندمان استخراج می-باشد. تأثیر متغیرهای مختلف در قسمت استخراج شامل نسبت دانه به آب مقطر (۱:۲۰ - ۱:۱۰)، دمای استخراج (۷۵ - ۵۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان استخراج (۴۰ - ۲۰ دقیقه) و در قسمت فراصوت شامل توان (۴۰۰ - ۲۰۰ وات)، دما (۴۰ - ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۳۰ - ۱۵ دقیقه) بر روی راندمان استخراج مورد بررسی قرار گرفت که نتایج، در جداول ۳ و ۴ آمده است. این جداول مقادیر راندمان به دست آمده از آزمایشات و مقادیر راندمان پیش بینی شده توسط مدل و اختلاف این دو مقدار را نشان می‌دهد.

ارزیابی مقادیر به دست آمده توسط آنالیز واریانس (ANOVA) و معنی‌دار بودن مدل و مقادیر رگرسیونی به دست آمده توسط مقادیر P صورت گرفت که در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است. مقادیر F برای مدل قسمت استخراج، ۳۳/۹۶ و برای مدل فراصوت، ۱۰۹/۰۷ بود که نشان دهنده معنی‌دار بودن مدل در مقادیر P کمتر از ۰/۰۰۱ ($P < 0.0001$) است. مقدار F پارامتر عدم تطابق^۳ برای قسمت استخراج، ۳/۱۳ و مقدار P مربوط به آن، ۰/۱۴۹۹، برای قسمت فراصوت، ۱/۰۴ و مقدار P آن ۰/۴۶۴۹ به دست آمد که نشان دهنده غیر معنی‌دار بودن آن

می‌باشد. به طور کلی در قسمت آنالیز واریانس، مقادیر مربوط به مدل باید معنی‌دار و مقادیر به دست آمده برای پارامتر عدم تطابق، باید غیر معنی‌دار باشند که در این پژوهش نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس این وضعیت را تأیید کرد. علاوه بر محاسبه این پارامترها، عوامل دیگری نیز جهت بررسی دقیق‌تر مدل به کار می‌روند که شامل ضریب تبیین^۴ (R^2)، ضریب تبیین اصلاح شده^۵ ($Adj-R^2$) و ضریب تغییرات^۶ (CV) می‌باشد. مقادیر R^2 و $Adj-R^2$ مربوط به بهینه سازی قسمت استخراج به ترتیب ۰/۹۷۷۶ و ۰/۹۴۸۸ و قسمت فراصوت به ترتیب ۰/۹۹۲۹ و ۰/۹۸۳۸ به دست آمدند که تأییدی بر درستی مدل انتخاب شده برای هر قسمت و کل فرآیند می‌باشد. افزودن یک متغیر جدید به مدل سبب افزایش مقدار R^2 می‌شود و بالا بودن مقدار این پارامتر همیشه به دلیل دقیق و مناسب بودن مدل انتخاب شده نمی‌باشد. در نتیجه، از ضریب تبیین

اصلاح شده یا $Adj-R^2$ استفاده می‌گردد تا این تردید برطرف شود [۱۶]. پارامتر ضریب تغییرات یا CV برای قسمت استخراج و فراصوت به ترتیب ۲/۶۴ و ۰/۷۳ به دست آمد. به طور کلی، مقادیر CV بالاتر از ۱۰، نشان می‌دهد که تغییرات از مقدار میانگین بیشتر است و در نتیجه مدل انتخاب شده نمی‌تواند از دقت کافی برخوردار باشد. مقادیر پایین به دست آمده برای این پارامتر گواه دیگری بر صحت مدل انتخاب شده و دقت کافی آن می‌باشد [۱۷].

برای بررسی ارتباط بین متغیرهای فرآیند و راندمان به عنوان پاسخ اندازه گیری شده، از معادله رگرسیونی به دست آمده برای قسمت فراصوت استفاده می‌گردد که به صورت زیر است:

معادله (۲)

$$Y = 2.59 + 0.072 A + 0.38 B + 0.16 C - 0.040 AB + 0.013 AC + 0.037 BC + 0.035 A^2 + 0.057 B^2 - 0.055 C^2$$

4. Coefficient of determination

5. Adjusted coefficient of determination

6. Coefficient of variance

3. Lack of fit

Table 3 BBD design of extraction stage

Standard order	A	B (°C)	C (min)	Actual value	Predicted value	Residual
1	1:10	55	30	2.136	2.18588	-0.04988
2	1:15	65	30	2.624	2.5878	0.0362
3	1:20	65	40	2.825	2.81025	0.01475
4	1:10	75	30	3.084	3.02888	0.05512
5	1:15	75	20	2.736	2.77638	-0.04038
6	1:20	65	20	2.459	2.4685	-0.0095
7	1:15	55	40	2.370	2.32963	0.04037
8	1:10	65	20	2.335	2.34975	-0.01475
9	1:15	55	20	2.151	2.08638	0.06462
10	1:15	65	30	2.644	2.5878	0.0562
11	1:10	65	40	2.651	2.6415	0.0095
12	1:15	65	30	2.595	2.5878	0.0072
13	1:15	65	30	2.553	2.5878	-0.0348
14	1:20	55	30	2.354	2.40913	-0.05513
15	1:15	65	30	2.523	2.5878	-0.0648
16	1:20	75	30	3.143	3.09313	0.04987
17	1:15	75	40	3.102	3.16662	-0.06462

معنی دار هستند که این امر از روی مقادیر P ($p < 0.05$) مشخص می شود اما ضرایب درجه دوم دیگر (B^2 و C^2) و ضرایب مربوط به اثر متقابل (AB ، AC و BC) به دلیل داشتن مقادیر P بالاتر از ۰/۰۵ تأثیر معنی داری روی راندمان استخراج ندارند.

که در اینجا Y نشان دهنده متغیر پاسخ یا راندمان و A ، B و C به ترتیب نشان دهنده متغیرهای مستقل توان، دما و زمان می باشند. همان طور که از جدول شماره ۶ نیز استنباط می گردد، ضرایب خطی (A ، B و C) و یکی از ضرایب درجه دوم (A^2)

Table 4 BBD design of ultrasound stage

Standard order	A (W)	B (°C)	C (min)	Actual value	Predicted value	Residual
1	400	32.5	30	3.748	3.76363	-0.01563
2	300	25	15	3.305	3.32563	-0.02063
3	400	25	22.5	3.582	3.57375	0.00825
4	400	40	22.5	3.698	3.703	-0.005
5	300	25	30	3.504	3.49662	0.00738
6	300	40	15	3.392	3.39938	-0.00738
7	300	40	30	3.628	3.60738	0.02062
8	300	32.5	22.5	3.476	3.4626	0.0134
9	200	40	22.5	3.153	3.16125	-0.00825
10	300	32.5	22.5	3.451	3.4626	-0.0116
11	200	32.5	15	3.085	3.06938	0.01562
12	300	32.5	22.5	3.482	3.4626	0.0194
13	200	25	22.5	3.111	3.106	0.005
14	200	32.5	30	3.216	3.22837	-0.01237
15	400	32.5	15	3.556	2.54363	0.01237
16	300	32.5	22.5	3.480	3.4626	0.0174
17	300	32.5	22.5	3.424	3.4626	-0.0386

معادله رگرسیونی مربوط به قسمت استخراج به صورت زیر است:

معادله (۳)

$$Y = 3.46 + 0.25 A + 0.046 B + 0.095 C + 0.018 AB + 0.015 AC + 0.009250 BC - 0.066 A^2 - 0.010 B^2 + 0.004950 C^2$$

که در اینجا Y نشان دهنده متغیر پاسخ یا راندمان و A، B و C به ترتیب نشان دهنده متغیرهای مستقل نسبت دانه به آب مقطر،

دمای استخراج و زمان استخراج می‌باشند. همان طور که در جدول شماره ۵ نیز مشهود است، ضرایب خطی (A، B و C) معنی‌دار هستند که این امر از روی مقادیر P ($p < 0.05$) مشخص می‌شود اما ضرایب درجه دوم (A^2 ، B^2 و C^2) و ضرایب مربوط به اثر متقابل (AB، AC و BC) به دلیل داشتن مقادیر P بالاتر از ۰/۰۵ معنی‌دار نیستند [۱۸].

Table 5 Analysis of Variance (Extraction stage)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value
Model	1.45	9	0.16	33.96	<0.0001
A – Seed to water	0.041	1	0.041	8.71	0.0214
B - Temperature	1.17	1	1.17	245.73	<0.0001
C - Time	0.20	1	0.20	42.29	0.0003
AB	0.006320	1	0.006320	1.33	0.2863
AC	0.0006250	1	0.0006250	0.13	0.7274
BC	0.005402	1	0.005402	1.14	0.3214
A ²	0.005041	1	0.005041	1.06	0.3370
B ²	0.014	1	0.014	2.87	0.1342
C ²	0.013	1	0.013	2.67	0.1460
Residual	0.033	7	0.004745		
Lack of fit	0.023	3	0.007760	3.13	0.1499
Pure error	0.009931	4	0.002483		
Total	1.48	16			
R ²	0.9776				
Adj-R ²	0.9488				
CV	2.64				
PRESS	0.39				
Standard deviation	0.069				
Adequate precision	20.448				

Table 6 Analysis of Variance (Ultrasound stage)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value
Model	0.62	9	0.069	109.07	<0.0001
A – Power	0.51	1	0.51	806.34	<0.0001
B - Temperature	0.017	1	0.017	26.93	0.0013
C - Time	0.072	1	0.072	113.65	<0.0001
AB	0.001369	1	0.001369	2.17	0.1845
AC	0.0009303	1	0.0009303	1.47	0.2644
BC	0.0003422	1	0.0003422	0.54	0.4857
A ²	0.019	1	0.019	29.29	0.0010
B ²	0.0004467	1	0.0004467	0.71	0.4283
C ²	0.0001032	1	0.0001032	0.16	0.6982
Residual	0.004423	7	0.0006319		
Lack of fit	0.001940	3	0.0006467	1.04	0.4649
Pure error	0.002483	4	0.0006208		
Total	0.62	16			
R ²	0.9929				
Adj-R ²	0.9838				
CV	0.73				
PRESS	0.035				
Standard deviation	0.025				
Adequate precision	36.009				

۳-۱-۲- آنالیز سطح پاسخ

۳-۱-۲-۱- تأثیر متغیرهای استخراج بر راندمان صمغ

تأثیر هر کدام از متغیرهای استخراج (نسبت دانه به آب مقطر، دما و زمان) بر روی راندمان صمغ تولیدی و هم چنین اثرات متقابل آن‌ها، در نمودارهای رویه سه بعدی (Figure 1) نشان داده شده است.

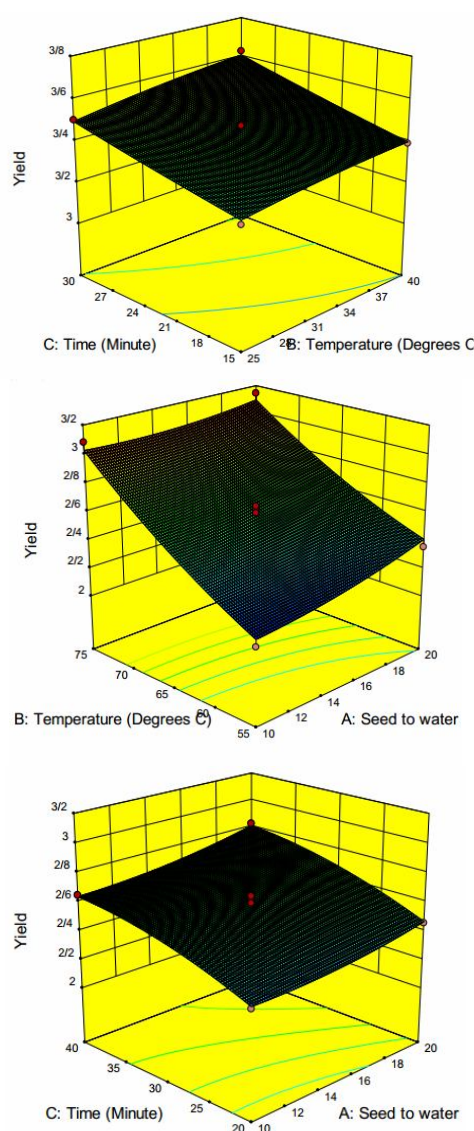


Fig 1 3D response plots of extraction variables

بررسی اثرات متقابل این متغیرها بر روی راندمان نشان داد که افزایش نسبت دانه به آب مقطر از ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۲۰ سبب افزایش راندمان استخراج در تمامی دماها و زمان‌های مورد آزمایش گردید (شکل شماره ۱ - a و 1 - b). هم چنین نتایج حاصل نشان داد که بین این متغیرها اثر متقابل وجود ندارد و مدل انتخاب شده، خطی می‌باشد. هم چنین، راندمان استخراج با افزایش دما از ۵۵ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد در تمامی زمان‌ها و نسبت‌های دانه به آب مقطر، افزایش یافت (شکل شماره 1 - a و 1 - c). موارد فوق برای نسبت دانه به آب مقطر و دمای استخراج، برای زمان استخراج نیز صادق است. به این صورت که افزایش زمان استخراج از ۲۰ تا ۴۰ دقیقه، سبب بهبود راندمان استخراج گشت (تصویر شماره 1 - b و 1 - c). در بین سه متغیر مورد بررسی در قسمت استخراج، دمای استخراج بیشترین تأثیر را بر روی راندمان داشت [۱۹].

۳-۱-۲-۲- تأثیر متغیرهای فراصوت بر راندمان صمغ

تأثیر هر کدام از متغیرهای فراصوت (توان، دما و زمان) بر روی راندمان صمغ تولیدی و هم چنین اثرات متقابل آن‌ها، در نمودارهای رویه سه بعدی (Figure 2) نشان داده شده است. بررسی اثرات متقابل این متغیرها بر روی راندمان صمغ نشان داد که افزایش توان فراصوت از ۲۰۰ تا ۴۰۰ وات سبب افزایش راندمان استخراج در تمامی دماها و زمان‌های مورد آزمایش گردید (تصویر شماره 2 - a و 2 - b). نکته‌ای که باید به آن توجه داشت این است که توان فراصوت پایین به دلیل انرژی کم، نمی‌تواند سبب افزایش استحصال موسیلاژ از دانه شود و افزایش توان فراصوت به بیش از ۴۰۰ وات هم تأثیر معنی‌داری بر راندمان نداشت. هم چنین، راندمان استخراج با افزایش دما از ۲۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد در تمامی زمان‌ها و توان‌های فراصوت، افزایش یافت (شکل شماره 2 - a و 2 - c). موارد گفته شده برای توان و دمای فراصوت، برای زمان فراصوت نیز صادق است. به این صورت که افزایش زمان استخراج از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه، سبب بهبود راندمان استخراج شد (تصویر شماره 2 - b و 2 - c). در بین سه متغیر مورد بررسی در قسمت فراصوت، توان فراصوت و زمان فراصوت بیشترین تأثیر را در افزایش راندمان استخراج داشت [۲۰].

۲-۳- راندمان صمغ تولیدی

بالاترین راندمان صمغ دانه بارهنگ استخراج شده با پیش تیمار فراصوت حدود ۳/۷ گرم پودر خشک شده به ازای ۱۰۰ گرم دانه به دست آمد (۳/۷٪) که این مقدار مربوط به بعد از مراحل بهینه سازی است. این راندمان بالاتر از مقادیر ارائه شده برای صمغ دانه *Durio zibethinus* (۱/۲٪) [۲۱] و پایین تر از مقادیر به دست آمده برای صمغ دانه کتان (۷/۹٪) [۲۲] و دانه قدومه شهری (۲۹/۰۴٪) [۴] بود.

۳-۳- اندازه گیری رطوبت، خاکستر و پروتئین

صمغ دانه بارهنگ

اندازه گیری مقادیر رطوبت، خاکستر و پروتئین صمغ دانه بارهنگ با روش استاندارد AOAC (2005) انجام شد و به ترتیب اعداد $0.50 \pm 0.20\%$ ، $0.04 \pm 0.23\%$ و $0.01 \pm 0.03\%$ حاصل شد. نکته قابل توجه این است که بعد از رسوب دهی صمغ استحصال شده، خالص سازی کامل پلی ساکارید صورت گرفت در نتیجه اندازه گیری مقدار چربی کل چندان اهمیت نداشت و از آن صرف نظر گردید. اندازه گیری مقادیر پروتئین و خاکستر صمغ دانه بارهنگ به نوعی تعیین کننده خلوص صمغ نیز هست به این صورت که هرچه قدر مقدار پروتئین و خاکستر در صمغ استحصال شده پایین تر باشد نشان می دهد که صمغ دارای خلوص بیشتری است و قسمت اصلی و عمده آن را پلی ساکارید تشکیل می دهد [۲۳]. مقادیر پروتئین به دست آمده برای این صمغ بالاتر از صمغ دانه ریحان با 0.21% [۱۵] و پایین تر از مقادیر موسیلاژ صمغ دانه شاهی با $0.22/0.75\%$ [۱۵]، صمغ دانه به با $0.2/0.71\%$ [۱۸]، صمغ دانه قدومه با $0.4/6\%$ [۴]، موسیلاژ دانه بارهنگ با $0.6/66\%$ [۸] و صمغ دانه خرنوب با $0.7/4\%$ [۱۹] بود. هم چنین مقادیر خاکستر اندازه گیری شده برای این صمغ بالاتر از صمغ دانه خرنوب با $0.1/5\%$ [۱۹] و صمغ دانه قدومه با 0.18% [۴] و پایین تر از صمغ دانه شاهی با $0.5/0.5\%$ [۱۵]، صمغ دانه به با $0.6/71\%$ [۱۸]، موسیلاژ دانه بارهنگ با $6/80\%$ [۸] و صمغ دانه ریحان با $0.5/89\%$ [۱۵] بود. به عبارتی رسوب دهی و مراحل خالص سازی صمغ دانه بارهنگ سبب شده است که مقادیر پروتئین و خاکستر آن نسبت به موسیلاژ کمتر گردد و درجه خلوص آن افزایش یابد [۲۴].

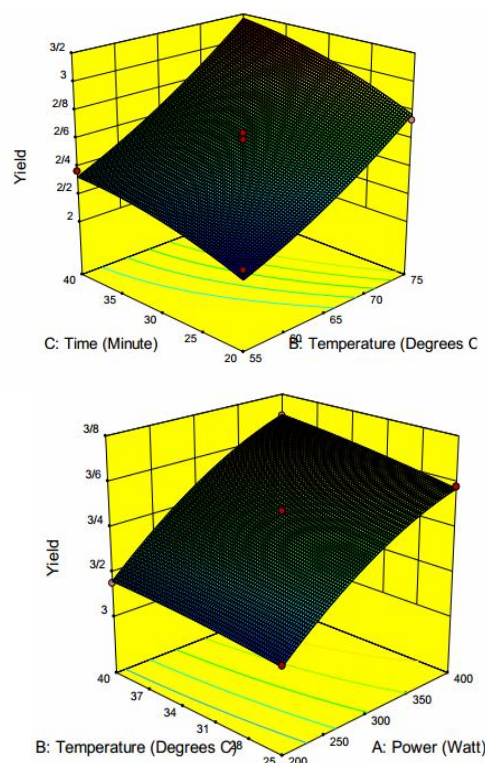


Fig 2 3D response plots of ultrasound variables

۳-۱-۳- بهینه سازی و اعتبار سنجی مدل

شرایط بهینه به دست آمده برای هر دو قسمت فرآیند (استخراج و فراصوت) شامل نسبت دانه به آب مقطر ۱:۲۰، دمای ۷۵ درجه سانتی گراد، زمان ۴۰ دقیقه، توان فراصوت ۴۰۰ وات، دمای فراصوت ۳۵ درجه سانتی گراد و زمان فراصوت ۳۰ دقیقه می باشد. برای تعیین دقت و درستی شرایط بهینه به دست آمده، ۳ تکرار انجام شد و میانگین این ۳ تکرار به عنوان مقدار حاصل از آزمایش در نظر گرفته شد. عدد به دست آمده، $0.33 \pm 0.37/32\%$ بود که به مقدار پیش بینی شده توسط مدل برای شرایط بهینه (۳/۷۵۷٪) نزدیک بود. آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی داری بین این دو عدد (عدد حاصل از میانگین ۳ تکرار و عدد پیش بینی شده) وجود نداشت ($p > 0.05$) در نتیجه می توان گفت که مدل های انتخاب شده برای هر قسمت از دقت کافی برخوردارند و برای فرآیند استخراج صمغ از دانه بارهنگ مناسب می باشند.

استخراج (حدود ۳/۷ گرم پودر صمغ به ازای ۱۰۰ گرم دانه) به دست آمد. بعد از استخراج، خالص سازی و بهینه سازی صمغ استحصال شده، برخی خواص فیزیکوشیمیایی اولیه شامل رطوبت، خاکستر، پروتئین و کربوهیدرات مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاکی از وجود ۶/۲۰٪ رطوبت، ۳/۲۳٪ خاکستر، ۲/۰۳٪ پروتئین و ۸۸/۴۷٪ کربوهیدرات بود. هم چنین آنالیز مونوساکاریدهای صمغ دانه بارهنگ با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که بیشترین مونوساکارید تشکیل دهنده صمغ، آرابینوز و سپس رامنوز می باشد.

۵- منابع

- [1] Lie, J., & Nie, S. 2015. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. Food Hydrocolloids, 1 – 16.
- [2] Naji, S., Razavi, S.M.A., & Karazhiyan, H. 2012. Effect of thermal treatments on functional properties of cress seed (*Lepidium sativum*) and xanthan gums: A comparative study. Food Hydrocolloids, 28, 75 – 81.
- [3] Shabani, H., Askari, G., Jahanbin, K., & Khodaeian, F. 2016. Evaluation of physicochemical characteristics and antioxidant property of *Prunus avium* gum exudates. International Journal of Biological Macromolecules, 93, 436 – 441.
- [4] Koocheki, A., Taherian, A.R., Razavi, S.M.A., & Bostan, A. 2009. Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. Food Hydrocolloids, 23(8), 2369 – 2379.
- [5] Samuelsen, A. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. Journal of Ethnopharmacology, 71, 1 – 21.
- [6] Raza, A., Li, F., Xu, X., & Tang, J. 2017. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polysaccharides from the stem of *Trapa quadrispinosa* using response surface methodology. International Journal of Biological Macromolecules, 94, 335 – 344.
- [7] Rostami, H., & Gharibzadeh, S.M.T. 2016. Microwave-assisted extraction of jujube polysaccharide: Optimization, purification and functional characterization. Carbohydrate Polymers, 143, 100 – 107.

۳-۴- آنالیز مونوساکاریدهای صمغ دانه بارهنگ

برای آنالیز مونوساکاریدهای صمغ دانه بارهنگ از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و مجهز به شناساگر RI استفاده شد که ۸ نوع مونوساکارید برای این صمغ شناسایی شد که شامل گلوکز (۶/۷۶٪)، فروکتوز (۱/۹۲٪)، زایلوز (۱۰/۴۶٪)، رامنوز (۲۱/۸۴٪)، گالاکتوز (۲/۴۶٪)، آرابینوز (۵۲/۶۱٪) و گلوکورونیک اسید (۳/۶۹٪) بودند. در نتیجه، بیشترین مونوساکارید موجود در این صمغ آرابینوز و سپس رامنوز می باشد. از این خانواده، صمغ های دیگری نیز استحصال شده است که از این میان می توان به صمغ دانه اسفرزه اشاره کرد که براساس داده های گزارش شده در منابع، دارای مونوساکارید-های مانوز (۰/۴۰٪)، آرابینوز (۲۱/۹۶٪)، گالاکتوز (۳/۷۶٪)، رامنوز (۱/۵۰٪)، زایلوز (۵۶/۷۲٪) و گلوکز (۰/۶۴٪) می باشد که مقادیر کربوهیدرات کل به دست آمده برای این صمغ ۸۴/۹۸٪ بود که پایین تر از مقادیر به دست آمده برای صمغ دانه بارهنگ با ۸۸/۴۷٪ است [۲۰]. مقادیر کربوهیدرات کل صمغ دانه بارهنگ بالاتر از صمغ دانه شاهی با ۴۳/۵۱٪ [۱۵]، صمغ دانه اسفرزه، صمغ دانه قدومه با ۸۸/۲۳٪ [۴] و صمغ دانه به با ۷۹/۱۱٪ [۱۸] و پایین تر از صمغ دانه ریحان با ۹۲/۴۴٪ [۱۵] می باشد. اختلاف بین مقادیر کربوهیدرات کل به دست آمده برای صمغ دانه بارهنگ و موسیلاژ آن احتمالاً مربوط به فرآیند استخراج به ویژه قسمت خالص سازی صمغ و روش آنالیز کربوهیدرات می باشد [۲۵].

۳-۴- اندازه گیری pH

مقادیر pH صمغ دانه بارهنگ در ۳ تکرار اندازه گیری شد و 0.02 ± 4.25 به دست آمد که نزدیک به مقادیر تعیین شده در منابع برای صمغ عربی (۴/۵) بود [۲۶].

۴- نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از بهینه سازی فرآیند استخراج صمغ دانه بارهنگ با پیش تیمار فراصوت با روش سطح پاسخ و طرح Box-Behnken نشان داد که توان ۴۰۰ وات، دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد و زمان ۳۰ دقیقه، نسبت دانه به آب مقطر ۱ به ۲۰، دمای استخراج ۷۵ درجه سانتی-گراد و زمان استخراج ۴۰ دقیقه به عنوان حالت های بهینه بودند که در این حالت، بالاترین راندمان

- International Journal of Biological Macromolecules, 65, 215 – 221.
- [18] Afshari, K., Samavati, V., & Shahidi, S.A. 2015. Ultrasonic-assisted extraction and in vitro antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. International Journal of Biological Macromolecules, 74, 558 – 567.
- [19] Senthil Kumar, C., Sivakumar, M., & Ruckmani, K. 2016. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Cyphomandra betacea* and its biological activities. International Journal of Biological Macromolecules, 92, 682 – 693.
- [20] Samavati, V. 2014. Polysaccharide extraction from *Ablemoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. International Journal of Biological Macromolecules, 95, 588 – 597.
- [21] Amin, M.A., Shamsuddin Ahmad, A., Yinyin, Y., Yahya, N., & Ibrahim, N. 2007. Extraction, Purification and Characterization of Durian (*Durio zibethinus*) seed gum. Food Hydrocolloids, 21, 273 – 279.
- [22] Cui, W., Mazza, G., Oomah, B.D., & Billiaderis, C.G. 1994. Optimization of an aqueous extraction process for flaxseed gum by response surface methodology. LWT – Food Science and Technology, 27, 363 – 369.
- [23] Jouki, M., Mortazavi, S., Tabatabaei Yazdi, F., & Koocheki, A. 2014. Optimization of extraction, antioxidant activity and functional properties of quince seed mucilage by RSM. International Journal of Biological Macromolecules, 66, 113 – 124.
- [24] Dakia, P.A., Blecker, C., Roberta, C., Watheleta, B., & Paqueta, M. 2008. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre – treatment. Food Hydrocolloids, 22, 807 – 818.
- [25] Guo, Q., W. Cui, S., Wang, Q., & Young, J. 2008. Fractionation and physicochemical characterization of psyllium seed. Carbohydrate Polymers, 73, 35 – 43.
- [26] Yusuf, A.K. 2011. Studies on some physicochemical properties of the plant gum exudates of *Acacia senegal* (DAKWARA), *Acacia sieberiana* (FARARKAYA) and *Acacia nilotica* (BAGARUWA). Journal of Research in National Development, 9 (2), 10 – 17.
- [8] Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., Hesarinejad, M., Mortazavi, S., & Mohebbi, M. 2016. *Plantago major* seed mucilage: Optimization of extraction and some physicochemical and rheological aspects. Carbohydrate Polymers, 155, 68 – 77.
- [9] Dehghan Sekachaei, A., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Kashaninejad, M., & Maghsoudlou, Y. 2017. Optimization of ultrasound-assisted extraction of quince seed gum through Response Surface Methodology. Journal of Agricultural Science and Technology, 19, 323 – 333.
- [10] Izadiyan, P., & Hemmateenejad, B. 2016. Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design. Food Chemistry, 190, 864 – 870.
- [11] Wang, Y., Liu, Y., & Hu, Y. 2014. Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. Carbohydrate Polymers, 111, 324 – 332.
- [12] Campos, B., Ruivo, T., Scapim, M., Madrona, G., & Bergamasco, R. 2016. Optimization of the mucilage extraction process from chia seeds and application in ice cream as a stabilizer and emulsifier. LWT – Food Science and Technology, 65, 874 – 883.
- [13] AOAC. 2005. Official methods of analysis. Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- [14] Yebeyen, D., Lemenih, M., & Feleke, S. 2009. Characteristics and quality of gum arabic from naturally grown *Acacia senegal* (Linne) Willd. trees in the Central Rift Valley of Ethiopia. Food Hydrocolloids, 23, 175 – 180.
- [15] Naji – Tabasi, S., Razavi, S.M.A., Mohebbi, M., & Malaekheh-Nikouei, B. 2016. New studies on basil (*Ocimum bacilicum* L.) seed gum: Part 1 – Fractionation, physicochemical and surface activity characterization. Food Hydrocolloids, 52, 350 – 358.
- [16] Karazhiyan, H., Razavi, S.M.A., & O. Phillips, G. 2011. Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. Food Hydrocolloids, 25, 915 – 920.
- [17] Samavati, V., Lorestani, M., & Joolazadeh, S. 2014. Identification and characterization of hydrocolloid from *Cordia myxa* leaf.

***Plantago major* seed gum: Ultrasound-assisted extraction, purification and optimization**

Niknam, R.¹, Ayaseh, A.^{2*}, Ghanbarzadeh, B.³

1. MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

(Received: 2017/10/12 Accepted:2018/01/10)

Gums are polysaccharides that mostly originated from plant and microbial sources and they are widely used in food and pharmaceutical industries as thickening, gelling, stabilizer and emulsifier. *Plantago major* L. is a plant that sorted in Plantaginaceae family which have been used for a long time as an anti-infective, immune-modulating, antioxidant and also wound-curing purposes. Response Surface Methodology (RSM) and Box-Behnken design was used to optimize the ultrasound-assisted extraction of *Plantago major* seed gum process. Optimization was done at two stages: Ultrasound stage with three variables: ultrasonic power (200 – 400W), ultrasonic temperature (25 - 40°C) and ultrasonic time (15 – 30 min) and Extraction stage with three variables: seed:water ratio (1:10 – 1:20), extraction temperature (55 - 75°C) and extraction time (20 – 40 min). The results indicated that ultrasonic power of 400W, ultrasonic temperature of 35°C and ultrasonic time of 30 min, seed:water ratio of 1:20, extraction temperature of 75°C and extraction time of 40 min were the optimum conditions for extraction process. After extraction, purification and optimization, the chemical composition of the resulted gum including moisture, ash, protein and carbohydrate were evaluated. The results demonstrated that the gum consisted of 6.20% moisture, 3.23% ash, 2.03% protein and 88.47% carbohydrate. The monosaccharide composition analysis of this gum by HPLC indicated that the main monosaccharide constituents were arabinose (56.72%) and rhamnose (21.84%).

Key Words: Gum extraction, Ultrasound pre-treatment, *Plantago major* L. seed, Response Surface Methodology (RSM)

* Corresponding Author E-Mail Address: ayaseh@tabrizu.ac.ir