

بهینه سازی استخراج، بررسی خصوصیات شیمیایی، ساختاری و فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکاریدهای محلول در آب برگ فیجوا

مه رو مرادیان^۱، علی گنجلو^{۲*}، ماندانا بی مکر^۲

^۱دانش آموزانه کارشناسی ارشد فناوری مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۲استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۹)

چکیده

یافتن منابع طبیعی، ارزان قیمت و جدید پلی ساکاریدها به دلیل پتانسیل بالا برای بهره‌برداری در صنایع غذایی و دارویی ضروری است. لذا مطالعه حاضر با هدف بهینه سازی فرایند استخراج پلی ساکاریدها از برگ فیجوا به منظور به حداکثر رساندن راندمان، بررسی خصوصیات شیمیایی، ساختاری و بررسی فعالیت ضد اکسایشی انجام شد. در این راستا تاثیر سه فراسنجه مستقل شامل دمای استخراج (۵۰-۹۰ درجه سلسیوس)، pH آب (۳/۵-۹/۵) و مدت زمان استخراج (۴-۱۶ ساعت) بر راندمان استخراج پلی ساکاریدها ارزیابی گردید. شرایط بهینه به صورت دمای استخراج ۶۸ درجه سلسیوس، pH آب ۶/۷۵ و مدت زمان استخراج ۲/۹۶ ساعت به دست آمد. تحت شرایط بهینه میزان راندمان استخراج پیش بینی شده توسط مدل (۳/۳۸ درصد) با میزان راندمان استخراج تجربی ($3/35 \pm 0/02$ درصد) مطابقت داشت. خصوصیات اولیه شیمیایی پلی ساکاریدهای استخراج شده از برگ فیجوا تحت شرایط بهینه تعیین گردید. بر اساس نتایج بررسی خصوصیات شیمیایی، میزان کربوهیدرات کل معادل ۵۴/۳۷ درصد، پلی فنولها و پروتئین به ترتیب معادل ۰/۱۴ میلی گرم معادل گالیک اسید و ۰/۱۸ درصد بود. درطیف تبدیل فوریه مادون قرمز باندهای شاخص پلی ساکاریدها مشاهده گردید. پلی ساکاریدهای برگ فیجوا عمدتاً شامل مونوساکاریدهای گلوکز، ریبوز، مانوز، آرابینوز و گالاکتوز می باشند. نتایج بررسی فعالیت ضد اکسایشی بیانگر توانایی مطلوب پلی ساکاریدهای برگ فیجوا برای مهار رادیکالهای آزاد DPPH و احیا نمودن یون آهن است. درنهایت، برگ فیجوا را می توان به عنوان یک منبع طبیعی، ارزانقیمت و جدید برای استحصال پلی ساکاریدها با فعالیت زیستی مطلوب جهت تولید مواد غذایی فراسودمند یا داروها معرفی نمود.

کلید واژگان: استخراج، پلی ساکاریدها، برگ فیجوا، بهینه سازی، فعالیت ضد اکسایشی.

۱- مقدمه

پلی ساکاریدها که با بهم پیوستن مونوساکاریدها از طریق پیوندهای گلیکوزیدی تشکیل می شوند بطور گسترده ای در منابع گوناگون نظیر محصولات کشاورزی، میکروارگانیسم ها، منابع دریایی، مایعات بدن حیوانات و پوسته سخت پوستان یافت می شوند [۱]. پلی ساکاریدها با توجه به فعالیت های زیستی مختلف نظیر فعالیت ضد توموری [۲]، ضد پیری [۳]، ضد التهابی [۴]، فعالیت ضد اکسایشی [۵] و ضد باکتریایی [۶] نقش بسیار مهمی در رشد و توسعه اندام های حیاتی زنده دارند. لذا جستجو برای یافتن منابع طبیعی، جدید و ارزان قیمت به منظور استحصال پلی ساکاریدها به علت وجود پتانسیل بالا برای بهره برداری از این بسپارهای طبیعی غیر سمی در صنایع مختلف نظیر غذایی و دارویی ضروری به نظر می رسد. استخراج از ابتدایی ترین و مهم ترین اقدامات در جهت جداسازی انواع ترکیبات زیست فعال خصوصا پلی ساکاریدها از منابع مختلف گیاهی و جانوری بشمار می رود [۱۵]. به عنوان مثال، در پژوهشی پلی ساکاریدهای جنسینگ پرویی (*LepidiumMeyenii*) با استفاده از آب داغ استخراج گردید. بر اساس نتایج پلی ساکاریدهای جنسینگ پرویی فعالیت مهار کنندگی مطلوبی در برابر رادیکال های آزاد هیدروکسیل، آنیون های سوپراکسید و DPPH از خود نشان دادند [۷]. در پژوهشی ین و همکاران (۲۰۱۸) پلی ساکاریدهای نوعی قارچ به نام شیتاکه^۱ را استخراج نمودند. نتایج بیانگر قدرت بالای احیا کنندگی پلی ساکاریدهای قارچ شیتاکه بود [۸]. خمناخم و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی به استخراج پلی ساکاریدهای برگ زیتون پرداختند. نتایج حاکی از توانایی مهار رادیکال های آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی و فعالیت ضد میکروبی مطلوب پلی ساکاریدهای برگ زیتون بود [۹]. همچنین طی مطالعه ای در سال ۲۰۱۷ مشخص گردید پلی ساکاریدهای گیاه پنیرک (*Malvaegyptiaca*) از فعالیت ضد اکسایشی و ضد باکتریایی مطلوبی برخوردار هستند [۱۰].

از آنجایی که فراسنجه های متعدد بر کارایی فرایند استخراج تاثیر گذار هستند استفاده از روش های آماری سستی برای بررسی تاثیرات هر یک به تنهایی بسیار زمان بر می باشد و علاوه بر آن ممکن است تعامل میان آنها نیز نادیده گرفته شود.

لذا امروزه از تکنیک های ریاضی و آماری جدید به منظور بررسی اثرات چندین فراسنجه به صورت هم زمان و در زمانی کوتاه تر استفاده می شود. در این راستا از روش شناسی سطح پاسخ^۲ می توان برای بررسی تاثیرات خطی و برهم کنش بین فراسنجه های مختلف با تعداد کمتری از آزمایشات و در نهایت بهینه سازی فرایند استفاده نمود. از این تکنیک به طور موفقیت آمیزی خصوصا برای بررسی اثرات فراسنجه های مختلف و تعیین شرایط بهینه استخراج پلی ساکاریدها از منابع مختلف نظیر نوعی کلم [۱۱]، قره قاط [۱۲]، کامفری [۱۳]، نوعی قارچ وحشی (*Paxillus involutus*) [۱۴] و غلاف نخود فرنگی [۱۵] استفاده شده است.

فیجوا (*AccasellowianaBerg*) یک گونه خاص متعلق به خانواده موردیان (*Myrtaceae*) است. فیجوا یک درختچه همیشه سبز با برگ های بسیار خوشبو و بومی نواحی مرتفع آمریکای جنوبی است و با توجه به سازگاری بسیار خوبی که با مناطق نیمه گرمسیری و معتدل دارد در حال حاضر به طور گسترده در نیوزیلند و به طور محدود در برخی از کشورها کشت می شود. این گیاه در انتهای قرن نوزدهم به عنوان گیاه زینتی به نواحی مدیترانه معرفی شد اما امروزه برای استحصال میوه خوراکی پرورش می یابد [۱۵، ۱۶]. میوه فیجوا سفید، شیرین، بسیار معطر و شبیه به آناناس است. فعالیت های زیستی میوه فیجوا نظیر فعالیت ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضد التهابی و فعالیت ضد اکسایشی گزارش شده است [۱۷، ۱۸]. در این پژوهش با توجه به فقدان مطالعاتی در زمینه استخراج پلی ساکاریدها از برگ فیجوا به عنوان یک منبع طبیعی، ارزان و همیشه در دسترس، تاثیر فراسنجه های مستقل نظیر درجه حرارت، مدت زمان استخراج و pH حلال بر راندمان استخراج پلی ساکاریدها با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح باکس- بنکن بررسی و بهینه سازی فرآیند با هدف به حداکثر رساندن راندمان استخراج انجام شد. خصوصیات اولیه شیمیایی پلی ساکاریدهای به دست آمده تحت شرایط بهینه از طریق آزمون های شیمیایی و خصوصیات ساختاری از طریق تعیین مونوساکاریدها، طیف سنجی فرابنفش (UV^۳) و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR^۴) تعیین شد. در نهایت فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکاریدهای

2. Response surface methodology (RSM)

3. Ultraviolet

4. Fourier transform-infrared

1. Shiitake mushroom

$$Y(\%) = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

در این معادله، Y راندمان استخراج بر حسب درصد، W_2 وزن پلی ساکاریدهای خشک بر حسب گرم و W_1 وزن پودر خشک برگ فیجوا بر حسب گرم می باشد.

۲-۳-۲- تعیین خصوصیات شیمیایی و ساختاری

پلی ساکاریدهای برگ فیجوا

۲-۳-۱- روش های عمومی

محتوای قند کل به روش فنل - سولفوریک اسید با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد تعیین گردید [۲۰]. وجود قند احیا کننده به روش فهلینگ مورد بررسی قرار گرفت. محتوای فنول کل به روش رنگ سنجی فولین - سیکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۲۱] و برحسب میلی گرم معادل گالیک اسید به ازاء ۱۰۰ میلی گرم نمونه بیان شد.

۲-۳-۲- طیف سنجی فرابنفش (UV) و تبدیل فوریه

مادون قرمز (FT-IR)

طیف فرابنفش برای تعیین وجود پروتئین در نمونه پلی ساکاریدی در دامنه ۴۰۰ - ۲۰۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس توسط دستگاه طیف سنج نوری فرابنفش - مرئی به دست آمد.

از روش طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز برای شناسایی پیوندهای بین اتم های مختلف و گروه های عاملی استفاده شد. برای این منظور ۲ میلی گرم پلی ساکارید با ۳۰۰ میلی گرم پودر KBr مخلوط و به صورت قرص با ضخامت ۱ میلی متر فشرده شد و پیک ها توسط دستگاه طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز در محدوده فرکانس $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ به دست آمد [۲۲].

۲-۳-۳- شناسایی مونوساکاریدها

به منظور شناسایی مونوساکاریدها از روش الاتونجی و همکاران (۲۰۱۶) با اندکی تغییرات استفاده شد [۲۳]. ۳۰ میلی گرم از نمونه پلی ساکاریدی در ۲ میلی لیتر تری فلئورو استیک اسید (۲ مولار) حل شد و به مدت ۳ ساعت در آن با دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از حذف تری فلئورو استیک اسید باقیمانده توسط اتانول و تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء ترکیب به دست آمده با ۲۰ میلی گرم هیدروکسیل-آمین هیدروکلرید و ۲ میلی لیتر پیریدین در دمای

برگ فیجوا به روش های مها رادیکال های آزاد ۱،۱- دی فنیل - ۲- پیکریل - هیدرازیل (DPPH) و قدرتا حیا کنندگی آهن ارزیابی گردید.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- آماده سازی نمونه

برگ های فیجوا در پاییز ۹۴ از شهرستان رامسر تهیه شد و پس از شستشو در سایه و در دمای اتاق تا رسیدن به رطوبت $7/5 \pm 0/2$ درصد خشک شدند. برای حذف برخی از قندهای آزاد، اسیدهای آمینه و برخی فنول ها، نمونه های خشک شده با اتانول ۹۵ درصد (با رعایت نسبت ۲۰ میلی لیتر حلال به ازاء یک گرم ماده اولیه) 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 [۱۹].

۲-۲- استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب

برای استخراج پلی ساکاریدها، ۳ گرم پودر خشک برگ فیجوا گذرانده شده از الک با مش ۱۸ با ۹۰ میلی لیتر آب مخلوط شد. فرایند استخراج بر اساس فراسنجه های درجه حرارت (۹۰-۵۰ درجه سلسیوس)، مدت زمان استخراج (۴-۱ ساعت) و pH حلال (۳/۵-۹/۵) انجام شد. عصاره به دست 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 به دست آمده از سانتریفیوژ توسط دستگاه تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء در دمای ۶۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به یک پنجم حجم اولیه تغلیظ شد. پروتئین زدایی 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 پلی ساکاریدهای 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 [۱۹]. راندمان استخراج پلی ساکاریدها از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

کلریدریک اسید ۴۰ میلیمولار و محلول $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۲۰ میلی مولار می‌باشد. محلول معرف تازه با مخلوط کردن ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ آماده شد. ۱۵۰ میکرولیتر از محلول پلی‌ساکارییدی با غلظت‌های مختلف (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۲۸۵۰ میکرولیتر از محلول FRAP مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک نگهداری شد. میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید.

۲-۵- تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این مطالعه، برای اعمال روش شناسی سطح پاسخ، بررسی روابط میان فراسنجه‌های مستقل و پاسخ، ایجاد نمودارهای سه بعدی و بهینه یابی از نرم افزار آماری Design Expert (Minneapolis, USA) 7.0.3 استفاده شد. درجه حرارت، مدت زمان استخراج و pH حلال فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه در این پژوهش بودند. آزمایشات بر اساس طرح باکس-بنکن شامل ۱۷ تیمار با ۵ تکرار در نقطه مرکزی بود. سطوح بالا (+۱)، میانی (صفر) و پایینی (-۱) فراسنجه‌های مورد مطالعه بر اساس مطالعات اولیه انتخاب گردید (جدول ۱). از مدل چند جمله ای درجه دوم برای مدل سازی فرایند به منظور بیان اثرات اصلی و متقابل فراسنجه‌های مستقل بر پاسخ استفاده می‌شود. مدل درجه دوم را می‌توان به صورت زیر نوشت:

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

در این رابطه β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} ضرایب رگرسیونی به ترتیب برای عرض از مبدأ، اثرات خطی، درجه دوم، متقابل و $X_i X_j$ متغیرهای مستقل هستند. از آزمون ضعیف برازش، ضریب تغییرات (C.V.)، ضریب همبستگی (R^2)، ضریب همبستگی اصلاح شده ($\text{adj-}R^2$) و عدد p در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای بررسی صحت مدل و تاثیر فراسنجه‌ها استفاده شد. برای تعیین شرایط بهینه از روش بهینه سازی عددی^۵ با هدف به حداکثر رسیدن راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا استفاده شد. برای اعتبار سنجی مدل پیشنهادی، مقادیر پیشبینی شده با مقدار تجربی به دست آمده تحت شرایط بهینه مقایسه گردید.

۹۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت تیمار شد. سپس ترکیب به دست آمده با استفاده از غشاء نایلونی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر صاف گردید. در نهایت مشتقات تهیه شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله و ستون موئین سیلیسی شناسایی شدند.

۲-۴- اندازه گیری فعالیت ضد اکسایشی

پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا

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

۱-۱- دی‌فنیل - ۲- پیکریل - هیدرازیل (DPPH)

فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا طبق روش ژو و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی تغییرات مورد بررسی قرار گرفت [۲۴]. به طوری که ۱/۵ میلی‌لیتر از نمونه پلی‌ساکارییدی با غلظت‌های مختلف (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول DPPH (۰/۱ میلی مول بر لیتر در اتانول ۹۵ درصد) مخلوط شد. مخلوط حاصل هم زده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک نگهداری شد. مقدار جذب در ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری گردید. برای محاسبه درصد فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH از رابطه زیر استفاده شد.

$\text{DPPH} = \frac{1 - (A_2 - A_1)}{A_0} \times 100$

$$\text{DPPH} = \frac{1 - (A_2 - A_1)}{A_0} \times 100$$

در رابطه، A_0 : میزان جذب محلول DPPH بدون اضافه کردن نمونه؛ A_1 : میزان جذب نمونه پلی‌ساکارییدی بدون اضافه کردن محلول DPPH؛ A_2 : میزان جذب محلول DPPH و نمونه می‌باشد.

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

روش قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP)

برای اندازه گیری فعالیت ضد اکسایشی به روش قدرت احیا کنندگی آهن از روش یو و همکاران (۲۰۱۴) استفاده شد [۲۵]. محلول‌های مورد نیاز شامل بافر استات ۳۰۰ میلی مولار با pH معادل ۳/۶، محلول ۱۰ میلی مولار TPTZ تهیه شده با

Table 1 Levels of independent variables and related codes

Process variables	Symbol	Levels		
		-1	0	+1
Temperature (°C)	A	50	70	90
pH	B	3.5	6.5	9.5
Extraction time (h)	C	1	2.5	4

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی تأثیر فراسنجه‌های مستقل بر

راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها از برگ فیجوا

مقادیر تجربی راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا برای ۱۷ تیمار مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. بر این اساس مقدار راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا در محدوده ۳/۳۷ - ۱/۰۳ درصد قرار داشت. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس به دست آمده برای راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا در جدول ۳ ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود اثرات خطی، درجه دوم و متقابل فراسنجه‌های مستقل با توجه به مقدار بالای F-value و مقدار P به دست آمده تأثیر معنی داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد بر راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا داشتند. از طرفی آزمون ضعف برازش مدل در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار نبود که نشان‌دهنده کارایی مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا می‌باشد (جدول ۳). بر اساس جدول ۳ ضریب همبستگی و همبستگی اصلاح شده مدل به ترتیب معادل ۰/۹۹ و ۰/۹۸ بود که حاکی از دقت بالایی مدل برازش شده برای پیش‌بینی مقادیر پاسخ است.

مقدار کم ضریب تغییرات (۵/۰۵ درصد) نیز تایید کننده دقت مدل برازش شده بر داده‌های تجربی می‌باشد. در شکل ۱ نیز تطابق خوب نتایج تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با مدل رگرسیونی قابل مشاهده است. نمودار پرتوریشن به منظور بررسی ارزیابی حساسیت پاسخ به فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه در شکل ۲ نشان داده شده است. وجود خط صاف و انحناء در این نمودار به ترتیب نشانگر عدم حساسیت و حساسیت پاسخ به تغییرات فراسنجه‌های مستقل است [۲۶]. با توجه به شکل ۲ واضح است که راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا به ترتیب تحت تأثیر مدت زمان استخراج، درجه حرارت و pH حلال قرار دارد.

رابطه رگرسیونی زیر مدل برازش شده به منظور تخمین راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا تحت شرایط مورد مطالعه را به صورت کد گذاری شده نشان می‌دهد.

$$Y = +3.22 + 0.24 A + 0.22 B + 0.36 C - 0.23 AB - 0.14 AC + 14 BC - 1.18 A^2 - 0.51 B^2 - 0.56 C^2$$

در این رابطه، Y بیانگر راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا و A، B و C به ترتیب فراسنجه‌های کد گذاری شده برای درجه حرارت (درجه سلسیوس)، pH حلال و مدت زمان استخراج (ساعت) می‌باشد.

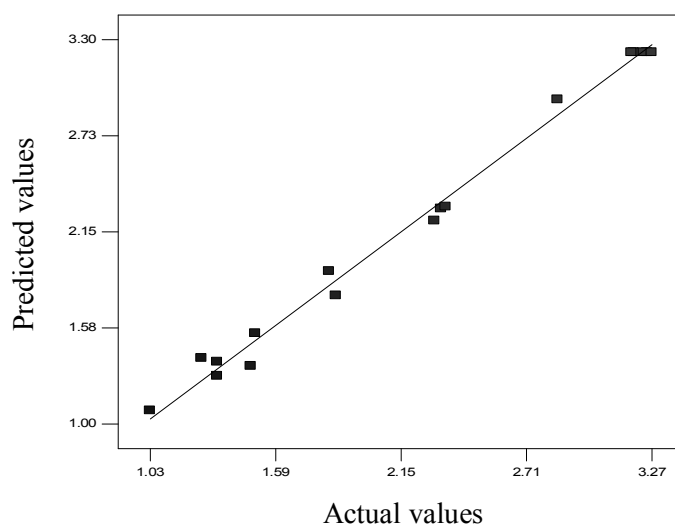
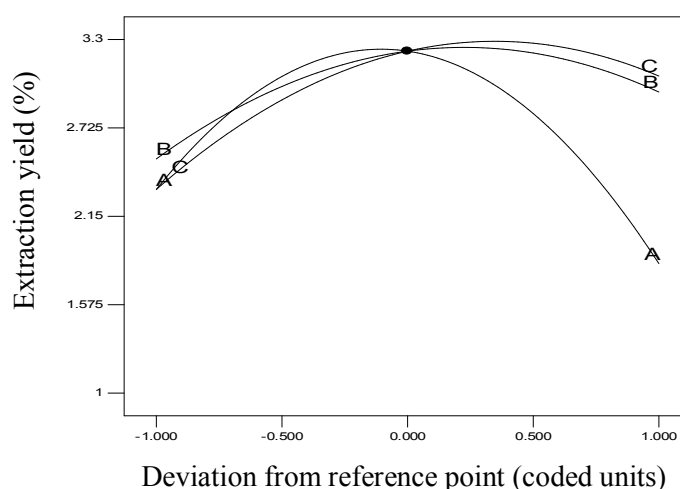
Table 2 The Box-Behnken design experimental and response values for the extraction yield.

Run	A: Temperature (°C)	B: pH	C: Extraction time (h)	Extraction yield (%)
1	50.00	3.50	2.50	1.26
2	90.00	3.50	2.50	1.33
3	50.00	9.50	2.50	2.33
4	90.00	9.50	2.50	1.48
5	50.00	6.50	1.00	1.33
6	90.00	6.50	1.00	1.03
7	50.00	6.50	4.00	2.35
8	90.00	6.50	4.00	1.50
9	70.00	3.50	1.00	1.86
10	70.00	9.50	1.00	1.87
11	70.00	3.50	4.00	2.30
12	70.00	9.50	4.00	2.85
13	70.00	6.50	2.50	3.24
14	70.00	6.50	2.50	3.37
15	70.00	6.50	2.50	3.25
16	70.00	6.50	2.50	3.24
17	70.00	6.50	2.50	3.35

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model obtained from experimental results.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	P value Prob>F
Model	11.320	9	1.260	98.26	< 0.0001
A: Temperature	0.470	1	0.470	38.62	0.00050
B:pH	0.400	1	0.400	31.39	0.00080
C:Extraction time	1.060	1	1.060	90.23	< 0.0001
AB	0.210	1	0.210	17.55	0.00470
AC	0.076	1	0.076	6.27	0.04460
BC	0.073	1	0.073	6.98	0.04760
A ²	5.850	1	5.850	454.46	< 0.0001
B ²	1.100	1	1.100	81.56	< 0.0001
C ²	1.310	1	1.310	98.38	< 0.0001
Residual	0.089	7	0.013		
Lack of Fit	0.072	3	0.024		0.0613
Pure Error	0.017	4	4.150E-003		
R ²	0.9922	ADJ-R ²	0.9822	C.V.	5.05%

تأثیر فراسنجه‌های مستقل مختلف بر میزان راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجواً به صورت نمودارهای سه بعدی و نمودارهای دو بعدی کانتور در شکل ۱ نشان داده شده است. به طور کلی نمودارهای کانتور دارای خطوط دایره ای یا بیضوی هستند. نمودارهای کانتور دایره ای بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بین متغیرها است در حالی که نمودارهای کانتور بیضوی حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین متغیرها می‌باشد [۲۷]. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش درجه حرارت تا ۷۰ درجه سلسیوس راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای برگ فیجواً افزایش یافت. افزایش دما با کاهش گرانیوی حلال که منجر به افزایش میزان نفوذ حلال به داخل ماتریکس گیاهی می‌شود و افزایش توانایی حلال برای حل کردن ترکیبات هدف در خود سبب افزایش راندمان استخراج می‌گردد [۱۱]. اما در ادامه با افزایش درجه حرارت میزان راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها کاهش یافت. استفاده از دمای بالا به دلیل تخریب حرارتی ساختار پلی‌ساکاریدها منجر به کاهش راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها می‌گردد [۲۸]. نتیجه مشابهی توسط لئو و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است به طوری که آنها نیز دریافتند که استفاده از درجه حرارت بالای ۷۰ درجه سلسیوس سبب کاهش راندمان استخراج پلی‌ساکاریدهای نوعی قارچ وحشی می‌گردد [۱۴]. با افزایش pH حلال تا حدود ۶/۵ راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها افزایش یافت. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش بیشتر pH حلال به سمت محدود قلیایی اندکی از راندمان استخراج کاسته شد. ژانگ و همکاران (۲۰۱۶)،

**Fig 1**Plot of Actual vs. Predicted values**Fig 2** Perturbation plot of extraction yield against (A) Temperature (°C), (B) pH and (C) Extraction time (h).

مدت زمان راندمان استخراج تغییر محسوسی مشاهده نگردید. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت جداسازی بخش اعظم پلی‌ساکاریدهای برگ فیجوا طی ۳ ساعت اولیه فرایند رخ داده است و سپس از سرعت جداسازی پلی‌ساکاریدها کاسته شده است. نتایج به دست آمده با نتایج وانگ و همکاران (۲۰۱۶) و سان و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت [۳۲، ۱۱].

وانگ و همکاران (۲۰۱۱) و وو و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که با افزایش pH حلال تا حدود ۷ راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها افزایش می‌یابد در حالی‌که با افزایش بیشتر pH تغییر چشمگیری در راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها مشاهده نمی‌شود [۲۹-۳۱]. به علاوه استفاده از pH پایین (۳/۵) نیز سبب آبکافت پلی‌ساکاریدها و در نتیجه کاهش راندمان استخراج می‌گردد [۳۱].

با افزایش مدت زمان استخراج تا حدود ۳ ساعت راندمان استخراج پلی‌ساکاریدها افزایش یافت اما با افزایش بیشتر

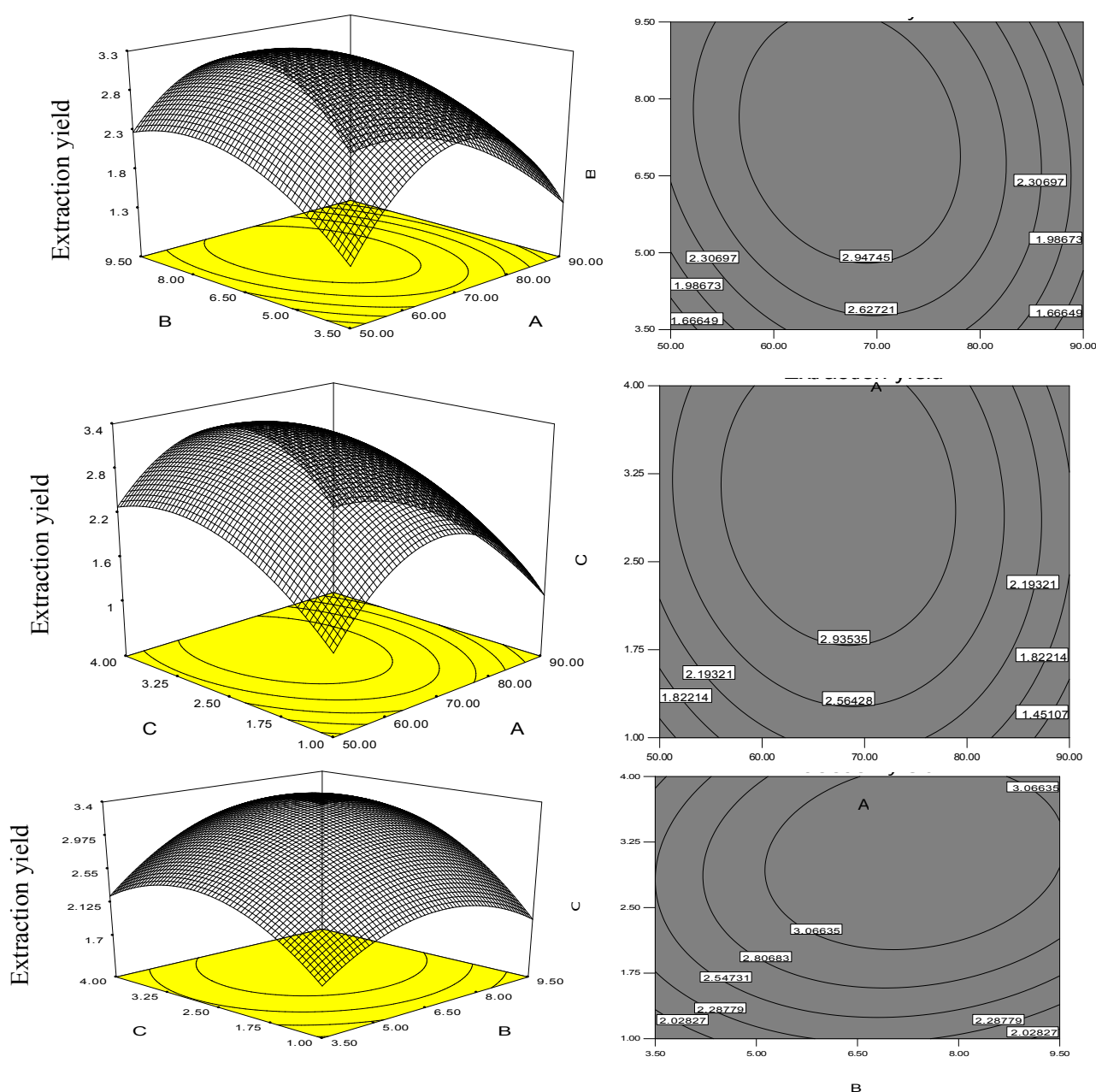


Fig 3 Response surface plots and contour plots showing the effects of (A) Temperature (°C), (B) pH and (C) Extraction time (h) on the extraction yield of water-soluble polysaccharides from Feijoa leaves.

سلسیوس، مدت زمان استخراج ۱۷۸ دقیقه و pH معادل ۶.۷۵. استخراج پلی ساکاریدها در شرایط بهینه اصلاح شده در سه تکرار به منظور مقایسه نتیجه پیشبینی شده با مقدار تجربی انجام شد. تحت شرایط بهینه اصلاح شده، راندمان تجربی استخراج پلی ساکاریدهای برگ فیجوا نزدیک به مقدار پیشبینی شده بود (جدول ۳). در نتیجه، روش شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح باکس- بنکن را می توان به عنوان یک ابزار دقیق و قاطع برای پیشبینی راندمان استخراج پلی ساکاریدهای برگ فیجوا نیز در نظر گرفت.

Table 4 Predicted and experimental values of the response at optimum conditions.

Extraction yield (%)		pH	Extraction time (h)	Temperature (°C)
Experimental	Predicted			
3.35±0.02	3.38	6.75	2.96	68

پوش طیف کامل فرابنفش پلی ساکاریدهای برگ فیجوا در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به وجود پیک در طول موج ۲۰۰-۲۱۵ نانومتر و عدم وجود پیک در دامنه ۲۸۰-۲۵۰ نانومتر ترکیب استخراج شده را می توان به عنوان پلی ساکاریدهای برگ فیجوا و عاری یا وجود مقدار ناچیزی از پروتئین ها یا نوکلئیک اسیدها معرفی نمود [۳۳]. نتیجه به دست آمده تایید کننده نتیجه مربوط به تجزیه و تحلیل اولیه شیمیایی پلی ساکاریدهای برگ فیجوا است (میزان پروتئین معادل ۰/۱۸±۰/۰۴).

همان طور که در شکل ۵ ملاحظه می شود طیف مادون قرمز پلی ساکاریدهای برگ فیجوا شامل یک پیک در محدوده $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ است که مربوط به ارتعاشات کششی گروه های هیدروکسیل است [۳۴]. باند مشاهده شده در محدوده 2900 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی و خمشی پیوند C-H می باشد که این باند به عنوان باند شاخص قندها محسوب می شود [۳۵]. وجود باند در محدوده 1617 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن COO^- است که نشان می دهد پلی ساکاریدهای برگ فیجوا ماهیت اسیدی دارند [۳۶]. مشاهده باندها در محدوده $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ تایید کننده ارتعاشات کششی C-O-H در گروه های جانبی و باندهای گلیکوزیدی (C-O-C) است. مشاهده باند در محدوده 1035 cm^{-1} تایید کننده فرم پیرانوزی قندها است [۳۷].

۳-۲- بهینه سازی و اعتبار سنجی شرایط فرایند

استخراج پلی ساکاریدهای برگ فیجوا

شرایط بهینه برای دستیابی به بالاترین راندمان استخراج پلی ساکاریدهای برگ فیجوا به صورت درجه حرارت ۶۷/۵۴ درجه سلسیوس، مدت زمان استخراج ۱۷۷/۶۰ دقیقه و pH معادل ۶/۷۵ به دست آمد. تحت این شرایط، حداکثر راندمان استخراج پیشبینی شده توسط مدل ۳/۳۸ درصد بود. با این حال، با توجه به محدودیت های شرایط واقعی استخراج، شرایط بهینه بدین شرح اصلاح شد: درجه حرارت ۶۸ درجه

۳-۳- بررسی خصوصیات اولیه شیمیایی

خصوصیات اولیه شیمیایی پلی ساکاریدهای برگ فیجوا تحت شرایط بهینه تعیین گردید. بر اساس نتایج به دست آمده میزان کربوهیدرات کل در پلی ساکاریدهای برگ فیجوا معادل $0/95 \pm 0/37$ درصد بود. وجود قندهای احیا کننده در پلی ساکاریدهای برگ فیجوا براساس نتیجه آزمون فهلینگ منفی است. میزان پلی فنول ها و پروتئین به ترتیب معادل $0/14 \pm 0/01$ میلی گرم معادل گالیک اسید به ازاء ۱۰۰ میلی گرم نمونه و $0/18 \pm 0/04$ درصد بود. مقادیر ناچیز پلی فنول ها و پروتئین ها حاکی از کفایت مراحل آماده سازی و پروتئین زدایی است.

۳-۴- شناسایی مونوساکاریدها

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مونوساکاریدها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف سنجی جرمی نشان داد که مونوساکاریدهای تشکیل دهنده پلی ساکاریدهای برگ فیجوا عمدتاً شامل ریبوز (۴۱/۲۱ درصد)، آرابینوز (۴/۳۷ درصد)، مانوز (۵/۱۰ درصد)، گلوکز (۴۴/۱۹ درصد) و گالاکتوز (۳/۲۱ درصد) می باشد. در نتیجه پلی ساکاریدهای برگ فیجوا را می توان به عنوان یک هتروپلی ساکارید محسوب نمود.

۳-۵- تجزیه و تحلیل ساختار پلی ساکاریدهای

برگ فیجوا

۰/۲ تا ۱ میلی گرم بر میلی لیتر فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از ۶۷ تا ۷۴/۲۵ درصد افزایش می‌یابد. علریغم اینکه فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط پلی ساکاریدهای برگ فیجوا در سطح مطلوبی قرار دارد اما نتایج به دست آمده بیانگر آنست که فعالیت مهار کنندگی پلی ساکاریدهای برگ فیجوا در تمام غلظت‌های مورد مطالعه کم‌تر از توانایی ویتامین ث می‌باشد. افزایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد با افزایش غلظت پلی ساکاریدها را می‌توان به افزایش شدت آزاد سازی الکترون‌ها یا اتم‌های هیدروژن و انتقال آنها به رادیکال‌های آزاد مرتبط دانست [۳۹]. ذکر این نکته ضروری است که نوع مونوساکاریدها، وزن مولکولی، نوع پیوندهای گلیکوزیدی، وجود ترکیباتی نظیر پلی فنول‌ها و گروه‌هایی مانند کربونیل و کربوکسیل در ساختار پلی ساکاریدها بر فعالیت ضد اکسایشی آنها تاثیر گذار است [۴۰]. بررسی منابع نشان می‌دهد که فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط پلی ساکاریدهای برگ فیجوا بیشتر از پلی ساکاریدهای برگ جینسینگ پرویی [۷]، کلم راپا [۱۱]، قره قاط [۱۲] و پوست هندوانه [۴۱] و اندکی کمتر از پلی ساکاریدهای پوست انار [۴۲] در غلظت برابر می‌باشد.

۳-۷- بررسی فعالیت ضد اکسایشی به روش

FRAP

جایگزینی انتقالی یون‌های فلزی نظیر Fe^{2+} یا Cu^{2+} می‌تواند سبب آغاز فرایندهای تولید رادیکال‌های آزاد گردد که در نهایت منجر به اکسایش چربی‌ها و وارد شدن آسیب به دئوکسی ریبونوکلیک اسید می‌گردد. احیاء شدن یون‌های فلزی می‌تواند اثر حفاظتی بر آسیب‌های اکسایشی داشته باشد [۴۳]. فعالیت احیا کنندگی برخی از گروه‌های عاملی نظیر OH، SH، COOH، S، C=O و O گزارش شده است [۳۶]. از طرفی ارتباط بین قدرت احیاء کنندگی پلی ساکاریدهای گیاهی با ظرفیت تعامل آنها با پیش سازهای پراکسید نیز گزارش شده است [۴۴]. همان‌طور که در شکل ۶ (ب) ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت پلی ساکاریدهای برگ فیجوا قدرت احیا کنندگی آنها نیز افزایش می‌یابد. به‌طوری که با افزایش غلظت پلی ساکاریدها در دامنه ۰/۲ - ۱ میلی گرم بر میلی لیتر قدرت احیا کنندگی آهن از ۱/۱۲ تا ۱/۹۸ میلی مول بر لیتر افزایش یافت. قدرت احیا کنندگی آهن پلی ساکاریدهای برگ فیجوا

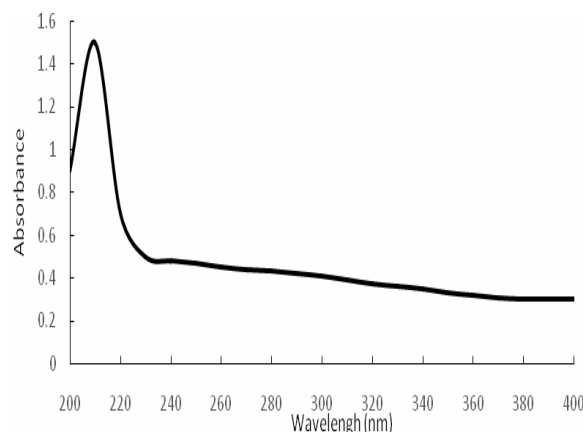


Fig 4 UV spectra of water-soluble polysaccharides from Feijoa leaf.

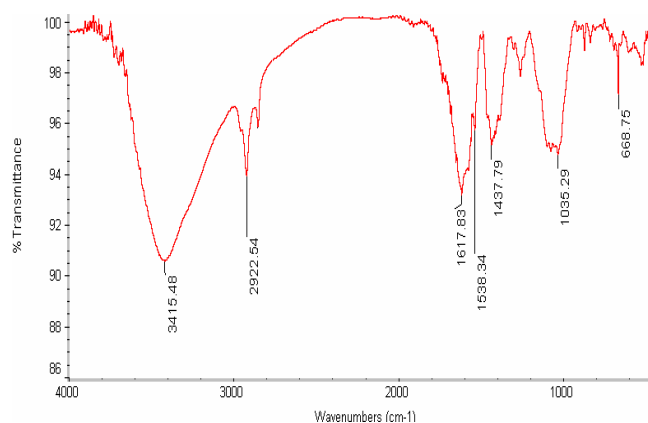


Fig 5 FT-IR spectra of water-soluble polysaccharides from Feijoa leaf within the frequency range of 4000–400 cm^{-1} .

۳-۶- بررسی فعالیت ضد اکسایشی به روش

DPPH

DPPH یک رادیکال آزاد ناپایدار با بیشترین مقدار جذب در ۵۱۷ نانومتر است که با دریافت هیدروژن به فرم پایدار $DPPH \cdot H$ تبدیل می‌شود که این مساله با تغییر رنگ محلول DPPH و تغییر میزان جذب محلول آن مشخص می‌شود [۳۸]. لذا این روش به طور گسترده برای ارزیابی فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در شکل ۶ (الف) توانایی پلی ساکاریدهای برگ فیجوا در مقایسه با ویتامین ث برای مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به غلظت پلی ساکاریدها وابسته است به طوری که با افزایش غلظت پلی ساکاریدها از

پلی ساکاریدهای برگ فیجوا عمدتاً از مونوساکاریدهای گلوکز، ریبوز، مانوز، آرابینوز و گالاکتوز تشکیل شده است. با بررسی فعالیت ضد اکسایشی به روش مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت احیاء کنندگی آهن مشخص گردید پلی ساکاریدهای برگ فیجوا از فعالیت ضد اکسایشی مطلوبی برخوردار هستند. بر اساس نتایج پژوهش حاضر برگ‌های فیجوا را می‌توان به عنوان یک منبع طبیعی، جدید و ارزان قیمت حاوی پلی ساکاریدهایی با فعالیت ضد اکسایشی مطلوب معرفی نمود. در نهایت انجام مطالعات تکمیلی در راستای بررسی ویژگی‌های عملکردی پلی ساکاریدهای برگ فیجوا و امکان سنجی استفاده از آنها به عنوان یک عامل ضد اکسایش در جهت تولید مواد غذایی فراسودمند ضروری به نظر می‌رسد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه زنجان جهت حمایت‌های مالی این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

۶- منابع

- [1] 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.
- [2] Wang, J., Bao, A., Meng, X., Guo, H., Zhang, Y., Zhao, Y., Kong, W., Liang, J., Yao, J., Zhang, J. 2018, An efficient approach to prepare sulfated polysaccharide and evaluation of anti-tumor activities *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, 184, 366-375.
- [3] Li, S., Liu, M., Zhang, C., Tian, C., Wang, X., Song, X., Jing, H., Gao, Z., Ren, Z., Liu, W., Zhang, J., Jia, L. 2018, Purification, *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-aging activities of soluble polysaccharides by enzyme-assisted extraction from *Agaricus bisporus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 457-466.
- [4] Mzoughi, Z., Abdelhamid, A., Rihouey, C., Le Cerf, D., Bouraoui, A., Majdoub, H. 2018, Optimized extraction of pectin-like polysaccharide from *Suaeda fruticosa* leaves: Characterization, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic

بیش از مقدار گزارش شده برای پلی ساکاریدهای میوه *Zizyphus lotus* [۱۵] بود.

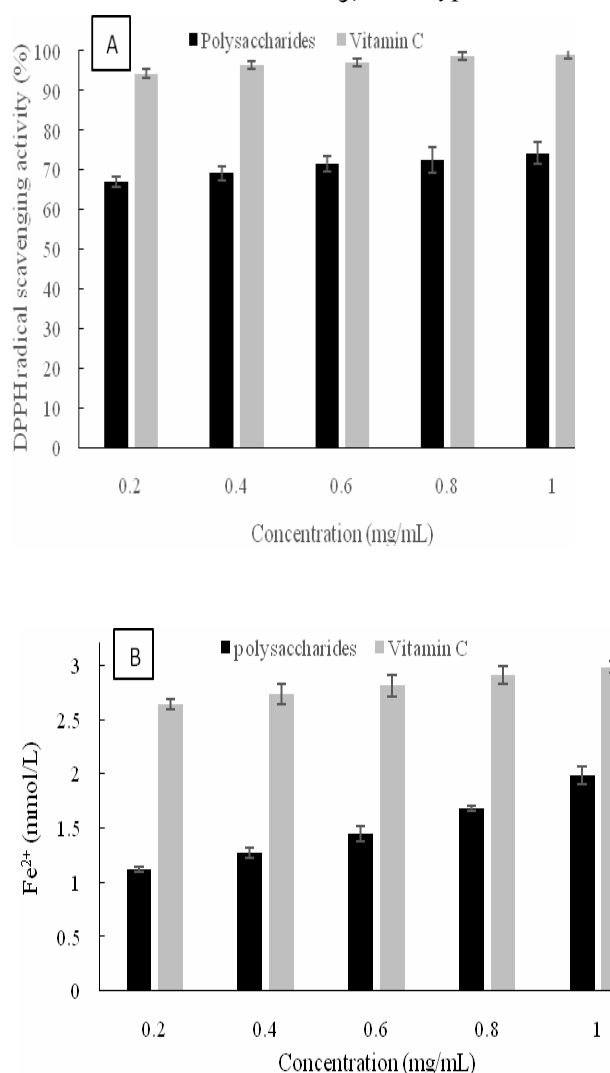


Fig 6 The effect of increasing concentration of water-soluble polysaccharides from Feijoa leave on DPPH radical scavenging activity (A) and FRAP (B). All the data were expressed as mean $\pm$ SD of three replicates.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش فرایند استخراج پلی ساکاریدهای برگ فیجوا با در نظر گرفتن درجه حرارت، مدت زمان استخراج و pH حلال به عنوان فراسنجه‌های مستقل بهینه سازی گردید. شرایط بهینه به صورت ۶۷/۵۴ درجه سلسیوس درجه حرارت، ۱۷۷/۶۰ دقیقه مدت زمان استخراج و pH معادل ۶/۷۵ به دست آمد. با بررسی خصوصیات شیمیایی و ساختاری وجود پلی ساکاریدها به عنوان ترکیب غالب تایید گردید.

- L. International Journal of Biological Macromolecules, 107, 938-948.
- [13] Shang, H., Zhou, H., Duan, M., Li, R., Wu, H., Lou, Y. 2018, Extraction condition optimization and effects of drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from comfrey (*Symphytum officinale* L.) root. International Journal of Biological Macromolecules, In Press. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.198>.
- [14] Liu, Y., Zhou, Y., Liu, M., Wang, Q., Li, Y. 2018, Extraction optimization, characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of a novel polysaccharide from the wild mushroom *Paxillus involutus*. International Journal of Biological Macromolecules, 112, 326-332.
- [15] Schotsmans, W.C., East, A., Thorp, G., Woolf, A.B. Feijoa (*Acca sellowiana* [Berg] Burret). In: Yahia, E.M. (Ed.), Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: cocona to mango, 3. Woodhead Publishing Ltd., UK, pp. 115-135. 2011.
- [16] Morton, J.F., Fruit of Warm Climates. 1987: Florida Flair Books, Miami, FL.
- [17] Vuotto, M.L., Basile, A., Moscatello, V., Desole, P., Cobianchi, R.C., Laghi, E., Ielpo, M.T.L. 2000, Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. International Journal of Antimicrobial Agents, 13, 197-201.
- [18] Weston, R.J. 2010, Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): a review. Food Chemistry, 121, 923-926.
- [19] Wen, L., Lin, L., You, L., Yang, B., Jiang, G., Zhao, M. 2011, Ultrasound-assisted extraction and structural identification of polysaccharides from *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth) H. Hara. Carbohydrate Polymers, 85, 541-547.
- [20] 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.
- [21] Li, J.E., Nie, S.P., Xie, M.Y., 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.
- activities. Carbohydrate Polymers, 185, 127-137.
- [5] Jalili Safaryan, M., Ganjloo, A., Bimakr, M., Zarringhalami, S. 2016, Optimization of Ultrasound-assisted extraction, preliminary characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from green pea pods. Foods, 5, doi:10.3390/foods5040078.
- [6] Ma, Y.-L., Zhu, D.-Y., Thakur, K., Wang, C.-H., Wang, H., Ren, Y.-F., Zhang, J.-G., Wei, Z.-J. 2018, Antioxidant and antibacterial evaluation of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.). International Journal of Biological Macromolecules, 111, 92-101.
- [7] Caicai, K., Limin, H., Liming, Z., Zhiqiang, Z., Yongwu, Y. 2018, Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from the leaves of maca (*Lepidium Meyenii*). International Journal of Biological Macromolecules, 107, 2611-2619.
- [8] Yin, C., Fan, X., Fan, Z., Shi, D., Gao, H. 2018, Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity. International Journal of Biological Macromolecules, In press. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.007>.
- [9] Khemakhem, I., Abdelhedi, O., Trigui, I., Ayadi, M.A., Bouaziz, M. 2018, Structural, antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides extracted from olive leaves. International Journal of Biological Macromolecules, 106, 425-432.
- [10] Fakhfakh, N., Abdelhedi, O., Jdir, H., Nasri, M., Zouari, N. 2017, Isolation of polysaccharides from *Malva aegyptiaca* and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. International Journal of Biological Macromolecules, 105, 1519-1525.
- [11] Wang, W., Wang, X., Ye, H., Hu, B., Zhou, L., Jabbar, S., Zeng, X., Shen, W. 2016, Optimization of extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L. International Journal of Biological Macromolecules, 82, 979-988.
- [12] Jooyandeh, H., Noshad, M., Khamirian, R.A. 2018, Modeling of ultrasound-assisted extraction, characterization and *in vitro* pharmacological potential of polysaccharides from *Vaccinium arctostaphylos*

- activity of intracellular selenium polysaccharide by *Cordyceps sinensis* SU-02. Carbohydrate Polymers, 86, 1745-1750.
- [31] Wu, Y., Cui, S.W., Tang, J., Gu, X. 2007, Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited *sterculia* seeds by response surface methodology. Food Chemistry, 105, 1599-1605.
- [32] Sun, Y., Liu, J., Kennedy, J.F. 2010, Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of *Codonopsis pilosula* by a central composite design. Carbohydrate Research, 80, 949-953.
- [33] He, R., Zhao, Y., Zhao, R., Sun, P. 2015, Antioxidant and antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from *E. sipunculoides*. International Journal of Biological Macromolecules, 78, 56-61.
- [34] Al-Sheraji, S.H., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R.M., Hassan, F.A. 2012, Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from the fibrous pulp of *Mangifera pajang* fruits. LWT - Food Science and Technology, 48, 291-296.
- [35] Luo, A., He, X., Zhou, S., Fan, Y., Luo, A., Chun, Z. 2010, Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. Carbohydrate Polymers, 79, 1014-1019.
- [36] Jiang, C., Li, X., Jiao, Y., Jiang, D., Zhang, L., Fan, B., Zhang, Q. 2014, Optimization for ultrasound-assisted extraction of polysaccharides with antioxidant activity *in vitro* from the aerial root of *Ficus microcarpa*. Carbohydrate Polymers, 110, 10-17.
- [37] Figueiro, S.D., Goes, J.C., Moreira, R.A., Sombra, A.S.B. 2004, On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan-collagen films. Carbohydrate Research, 56, 313-320.
- [38] Li, S. Q., Shah, N.P. 2014, Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC1275. Food Chemistry, 165, 262-270.
- [39] Lai, F., Wen, Q., Li, L., Wu, H., Li, X. 2010, Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic
- [22] Chen, Y., Luo, H., Gao, A., 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.
- [23] Olatunji, O.J., Feng, Y., Olatunji, O.O., Tang, J., Wei, Y., Zhen, O.Y., Su, Z.L. 2016, Polysaccharides purified from *Cordyceps cicadae* protects PC12 cells against glutamate-induced oxidative damage. Carbohydrate Polymers, 153, 187-195.
- [24] Xie, J.-H., Shen, M.-Y., Xie, M.-Y., Nie, S.-P., Chen, Y., Li, C., Huang, D.-F., Wang, Y.-X. 2012, Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *cyclocarya paliurus* (batal.) iljinskaja polysaccharides. Carbohydrate Polymers, 89, 177-184.
- [25] You, Q., Yin, X., Zhang, S., Jiang, Z. 2014, Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. Carbohydrate Polymers, 99, 1-10.
- [26] Bimakr, M., Rahman, R.A., Salina Taip, F., Adzahan, N.M., Sarker, M.Z.I., Ganjloo, A. 2013, Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from winter melon (*Benincasa hispida*) and its antioxidant activity and fatty acid composition. Molecules, 18, 997-1014.
- [27] Muralidhar, R.V., Chirumamila, R.R., Marchant, R., Nigam, P. 2001, A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindra* ceasing two different carbon sources. Biochemical Engineering Journal, 9, 17-23.
- [28] Zhang, T.T., Lu, C.L., Jiang, J.G., Wang, M., Wang, D.M., Zhu, W. 2015, Bioactivities and extraction optimization of crude polysaccharides from the fruits and leaves of *Rubus chingii* Hu. Carbohydrate Polymers, 130, 307-315.
- [29] Zhang, J., Meng, G., Zhai, G., Yang, Y., Zhao, H., Jia, L. 2016, Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. International Journal of Biological Macromolecules, 82, 432-439.
- [30] Wang, L., Wang, G., Zhang, J., Zhang, G., Jia, L., Liu, X., Deng, P., Fan, K. 2011, Extraction optimization and antioxidant

- [43] Shia, J.-J., Zhang, J.-G., Sun, Y.-H., Qu, J., Li, L., Prasad, C., Wei, Z.-J. 2016, Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides sequentially extracted from peony seed dreg, *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 23-30.
- [44] Cheng, Z., Zhang, Y., Song, H., Zhou, H., Zhong, F., Hu, H., Feng, Y. 2016, Extraction optimization, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Gentiana scabra* bge. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 369-380.
- [45] Mkadmini Hammi, K., Hammami, M., Rihouey, C., Le Cerf, D., Ksouri, R., Majdoub, H. 2016, Optimization extraction of polysaccharide from Tunisian *Zizyphus lotus* fruit by response surface methodology: Composition and antioxidant activity, *Food Chemistry*, 212, 476-484.
- assisted treatment. *Carbohydrate Polymers*, 81, 323-329.
- [40] Jahanbin, K., Gohari, A.R., Moini, S., Emam Djomeh, Z., Masi, P. 2011, Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* roots. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 567-572.
- [41] Romdhane, M.B., Haddar, A., Ghazala, I., Jeddou, K.B., Helbert, C.B., Ellouz-Chaabouni, S. 2017, Optimization of polysaccharides extraction from watermelon rinds: Structure, functional and biological activities, *Food Chemistry*, 216, 355-364.
- [42] Zhai, X., Zhu, C., Li, Y., Zhang, Y., Duan, Z., Yang, X. 2018, Optimization for pectinase-assisted extraction of polysaccharides from pomegranate peel with chemical composition and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 244-253.

Extraction optimization, chemical, structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from Feijoa leave

Moradian, M.¹, Ganjloo, A.^{2*}, Bimakr, M.²

1. MSc in Food Technology, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received: 2018/02/20 Accepted: 2018/10/21)

Finding natural, inexpensive and new polysaccharides resources is essential due to the high potential for utilization in the food and medicinal industries. Therefore, the current study was aimed to extraction optimization of polysaccharides from Feijoa leaves in order to maximize extraction yield and, evaluate chemical, structural characteristics and antioxidant activity. In this regard, the effects of three independent parameters including extraction temperature (50-90°C), pH of water (3.5-5.5) and extraction time (1-4 h) on the extraction yield were studied. Optimum conditions were obtained at extraction temperature of 68°C, pH of 6.75 and extraction time of 2.96 h. Under optimum conditions, the predicted yield (3.38%) was consistent with the experimental yield (3.35±0.02%). The preliminary chemical characteristics of the polysaccharides extracted from the Feijoa leaves were determined under optimum conditions. Based on the results obtained, total carbohydrate content was 54.77%, polyphenols and protein were 0.14 mg GAE/g and 0.18%, respectively. The FT-IR spectrum demonstrated obvious characteristic peaks of polysaccharides. Feijoa leave polysaccharides mainly consisted of glucose, ribose, mannose, arabinose and galactose. The results of antioxidant activity revealed the good ability of Feijoa leave polysaccharides to scavenge DPPH free radicals and to reducing iron ions. Finally, the Feijoa leave can be introduced as a natural, inexpensive and new resource for the extraction of polysaccharides with good biological activity for the production of functional foods or medicines.

Keywords: Extraction, Polysaccharides, Feijoa leave, Optimization, Antioxidant activity.

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