



صمغ دانه شنبلیله: بهینه سازی استخراج و ارزیابی ویژگی‌های ضد اکسایشی

الناز قبادی^۱، مهدی وریدی^{۲*}، محمد جواد وریدی^۲، آرش کوچکی^۳

1. دانشجوی دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
2. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
3. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: 96/2/16، تاریخ آخرین بازنگری: 96/4/26، تاریخ پذیرش: 96/5/1)

چکیده

پژوهش حاضر با استفاده از روش سطح پاسخ برای تعیین شرایط بهینه استخراج صمغ دانه شنبلیله با هدف دستیابی به حداکثر راندمان استخراج، ویسکوزیته، کربوهیدرات کل و حداقل پروتئین انجام شد. طرح آماری مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل شامل دمای استخراج 25-75 درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج 1-4 ساعت و نسبت آب به دانه 20-60 میلی‌لیتر بر گرم برای مطالعه متغیرها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که مدل چند جمله‌ای درجه دوم مناسب‌ترین مدل برای تفسیر رفتار هر چهار پاسخ بود. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که راندمان استخراج به‌طور معنی‌دار ($p < 0/05$) تحت تاثیر تمامی متغیرهای مستقل قرار گرفت، در حالی که تاثیر نسبت آب به دانه بر ویسکوزیته، پروتئین و کربوهیدرات کل معنی‌دار نبود ($p < 0/05$) با استفاده از روش بهینه سازی عددی شرایط بهینه استخراج صمغ دانه شنبلیله به‌صورت دمای استخراج 60/71 درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج 3/33 ساعت و نسبت آب به دانه 44/6 میلی‌لیتر بر گرم تعیین گردید. در شرایط بهینه، مقادیر راندمان استخراج، ویسکوزیته، کربوهیدرات کل و پروتئین به ترتیب 21/18 درصد، 29/06 میلی‌پاسکال ثانیه، 70/98 درصد و 4/19 درصد به‌دست آمد. هم‌چنین فعالیت ضد اکسایشی صمغ استخراج شده در نقطه بهینه توسط روش‌های قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی یون آهن سه ظرفیتی و قدرت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع نتایج نشان داد صمغ دانه شنبلیله دارای ویژگی ضد اکسایشی قابل توجه و وابسته به غلظت است. در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH 43/23 درصد، قدرت احیا کنندگی یون آهن سه ظرفیتی 650/76 میکرومولار و قدرت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل 46/95 درصد به‌دست آمد که به ترتیب معادل 50، 67 و 53/50 درصد قدرت ضد اکسایشی اسید آسکوربیک بود.

واژه‌های کلیدی: بهینه سازی استخراج، دانه شنبلیله، صمغ، ضد اکسایشی.

* نویسنده مسئول: m.varidi@um.ac.ir

1- مقدمه

47/79 درصد کربوهیدرات می‌باشد که از این مقدار 8/06

درصد آن را قندهای محلول در اتانول و 39/73 درصد آن را صمغ تشکیل می‌دهد [5]. با توجه به این که حدود 75 درصد صمغ شنبلیله را گالاکتومانان تشکیل می‌دهد [12]، میزان گالاکتومانان دانه شنبلیله را می‌توان حدود 30 درصد برآورد نمود. هر چند در منابع دیگر مقادیر بالاتر تا حدود 50 درصد وزن دانه نیز گزارش شده است [13]. در پژوهش‌های محدودی که در زمینه استخراج صمغ دانه شنبلیله انجام شده، راندمان‌های متفاوتی از 13/6 درصد [14] تا 22 درصد [5] به‌دست آمده است. هر چند شبیه سازی شرایط استخراج شده به روش برامر و همکاران در آزمایشگاه منجر به راندمان حدود 8 درصد گردید.

اکسایش یکی از فرایندهای اساسی بیولوژیکی برای تولید انرژی در موجودات زنده است [15]. هر چند تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد از نوع گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند منجر به بروز بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، التهاب‌های بافتی، آسیب‌های کبدی، بیماری‌های قلبی-عروقی، آلزایمر و پیری زودرس گردد [16، 17]. با این وجود امروزه استفاده از ترکیبات ضد اکسایش سنتزی به دلیل اثرات جانبی مانند سمیت، آسیب‌های کبدی و احتمال سرطان‌زایی محدود شده است [18، 19]. بنابراین برای حفاظت بدن از آسیب رادیکال‌های آزاد، کشف و استفاده از ترکیبات ضد اکسایش طبیعی در رژیم غذایی ضروری است. تحقیقات اخیر ثابت کرده است که پلی ساکاریدها دارای قدرت ضد اکسایشی قابل توجهی هستند [20-22]. در تحقیقات متعدد ویژگی ضد اکسایشی گالاکتومانان‌ها نیز به اثبات رسیده است. این ویژگی گالاکتومانان‌ها ناشی از قدرت جذب رادیکال آزاد، قدرت احیاء کنندگی و قدرت چلات کنندگی فلزات توسط آن‌ها می‌باشد [21، 23].

به‌علاوه صمغ دانه شنبلیله دارای خصوصیات درمانی است. به‌عنوان مثال سطح گلوکز خون را کاهش می‌دهد و تولید کلسترول در کبد را تنظیم می‌کند [24]. همچنین پایین آورنده قند خون در بیماران دیابتی نوع 1 و 2 است [25]. استخراج آبی یکی از رایج‌ترین شیوه‌های کاربردی به‌منظور استخراج صمغ از دانه‌ها به‌شمار می‌رود [26]. شرایط استخراج

صمغ‌ها برای توصیف گروهی از پلی ساکاریدهای طبیعی که کاربردهای صنعتی گسترده هم‌چون تشکیل ژل، تشکیل محلول‌های ویسکوز یا پایداری سیستم‌های غذایی دارند، استفاده می‌شوند. در سال‌های اخیر، تقاضا برای صمغ‌های گیاهی در سیستم‌های غذایی و دارویی به‌طور چشم‌گیر افزایش یافته است، زیرا این صمغ‌ها اجزاء تشکیل دهنده مهمی در سیستم‌های غذایی مایع و نیمه جامد محسوب می‌شوند [1].

شنبلیله گیاهی یک ساله است که متعلق به خانواده بقولات می‌باشد. این گیاه در هند، مصر و کشورهای خاورمیانه از جمله ایران کشت می‌شود. پلی ساکارید اصلی در آندوسپرم دانه شنبلیله گالاکتومانان است. گالاکتومانان یک پلی ساکارید خطی است که به‌عنوان یک منبع ذخیره انرژی در آندوسپرم دانه تمامی گیاهان خانواده بقولات وجود دارد [2]. گالاکتومانان از یک اسکلت خطی مانوز با اتصالات $\beta(4\rightarrow1)$ تشکیل شده که گالاکتوز به‌عنوان زنجیره فرعی با اتصالات $\alpha(6\rightarrow1)$ به آن پیوند داده است [3]. گالاکتومانان دانه شنبلیله مشابه گالاکتومانان دانه لوبیای لوکاست، گوار و تارا می‌باشد [4]، اما نسبت به آن‌ها میزان جایگزینی بیش‌تری دارد. نسبت گالاکتوز به مانوز در گالاکتومانان دانه شنبلیله از 1 به 1/02 تا 1 به 1/14 متغیر است [5].

گالاکتومانان‌ها خصوصیات رئولوژیکی و فیزیکوشیمیایی متفاوتی را نشان می‌دهند که بستگی به نسبت مانوز به گالاکتوز، توزیع گالاکتوز بر روی زنجیره اصلی مانوز، وزن مولکولی و چگونگی توزیع آن دارد [6]. گالاکتومانان‌ها در مواد غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی کاربردهای گوناگونی هم‌چون پرکننده و ماده زمینه در تولید قرص [7]، ماده پوشاننده در فرایند ریزپوشانی [8]، تولید فیلم بسته بندی [9]، افزایش قوام و پایدارکننده در سیستم‌های امولسیون و سوسپانسیون [10] و عامل امولسیون کننده، اصلاح کننده بافت و ژل کننده دارند. آن‌ها همچنین به‌عنوان فیبر غذایی و جایگزین چربی [11] قابل استفاده هستند.

دانه شنبلیله حاوی 7/49 درصد رطوبت، 7/24 درصد چربی، 34/10 درصد پروتئین، 3/38 درصد خاکستر و

ممرت ساخت کشور آلمان با دمای ثابت و معین قرار گرفت. پس از طی زمان لازم دانه‌ها به کمک قیف بوختر متصل به پمپ خلأ از محلول هیدروکلوئیدی جدا شدند. محلول تهیه شده به مدت یک شبانه روز در یخچال نگهداری شد و پس از آن با افزودن استون به میزان 3 برابر حجم، رسوب داده شد [29]. صمغ حاصل به وسیله صافی استیل جداسازی و سپس به منظور حذف استون و رطوبت در آن با جریان هوا در دمای 35 درجه سانتی‌گراد خشک گردید. عصاره خشک شده آسیاب و به وسیله الک با مش 80، اندازه ذره 177 میکرون، غربال شد و پس از بسته بندی تا زمان آزمون در جای خشک و خنک نگهداری گردید.

2-3- راندمان و درصد ترکیبات شیمیایی

راندمان صمغ استخراجی در شرایط مختلف، از طریق وزن کردن صمغ خشک شده و محاسبه درصد آن بر اساس وزن دانه‌ها تعیین شد [30]. تعیین پروتئین به روش کلدال با ضریب تبدیل 6/25 [31] و کربوهیدرات کل به روش فنل سولفوریک اسید [32] انجام شد. کلیه آزمون‌ها با حداقل دو تکرار انجام گرفتند.

2-4- ویسکوزیته

برای اندازه‌گیری ویسکوزیته محلول 0/3 درصد از هر نمونه در آب تهیه گردید و برای تکمیل جذب آب یک شب در یخچال نگهداری شد. محلول حاصل به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق با کمک همزن مغناطیسی همزده شد. ویسکوزیته محلول در سرعت برشی ثابت 46/16 بر ثانیه به‌عنوان سرعت برشی فرایند بلع دهانی مایعات با استفاده از رنومتر شرکت بروکفیلد مدل ال وی دی وی-اولترا ساخت کشور آمریکا به کمک اسپیندل LV1 در دمای اتاق اندازه‌گیری شد [33].

2-5- آزمون‌های قدرت ضد اکسایشی

2-5-1- قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH

قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH به روش شن و همکاران با اندکی اصلاحات انجام گرفت [34]. 2 میلی‌لیتر محلول DPPH 0/1 میلی‌مولار در اتانول 80 درصد با

در این روش، از جمله دما، زمان، نسبت آب به دانه، سرعت همزدن، تعداد دفعات استخراج و pH بر میزان راندمان و ویژگی‌های عملکردی، رئولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی صمغ حاصل موثر می‌باشد [27]. بررسی منابع نشان می‌دهد که با وجود مطالعات مختلف در مورد صمغ دانه شنبلیله [5، 12، 28] تاکنون پژوهشی در مورد بهینه سازی شرایط استخراج با هدف دستیابی به حداکثر راندمان و بررسی ویژگی‌های ضد اکسایشی این صمغ انجام نشده است. بر این اساس هدف پژوهش حاضر بررسی چگونگی تاثیر متغیرهای دما، زمان و نسبت آب به دانه در فرایند استخراج بر راندمان، ویسکوزیته، مقدار پروتئین و کربوهیدرات صمغ دانه شنبلیله و نیز تعیین ویژگی‌های ضد اکسایشی آن می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- آماده سازی نمونه

دانه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) بوم نمود اصفهان از شرکت پاکان بذر خریداری شد و در ظروف دربدار و در دمای محیط نگهداری گردید. دانه‌های شنبلیله ابتدا تمیز شده و مواد خارجی آن به صورت دستی حذف شدند. سپس توسط آسیاب خرد و از الک‌های با مش 10 و 30 عبور داده شد. بخش باقی مانده بر روی الک با مش 30، اندازه ذره کم‌تر از 2 و بزرگ‌تر از 0/6 میلی‌متر، جهت ادامه آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

2-2- استخراج آبی صمغ دانه شنبلیله

جهت استخراج صمغ از دانه شنبلیله سه متغیر شامل دما، زمان و نسبت آب به دانه به ترتیب هر کدام در محدوده 25-75 درجه سانتی‌گراد، 4-1 ساعت و 60-20 میلی‌لیتر آب به ازای هر گرم دانه در pH ثابت 7 اعمال شدند. برای تثبیت pH از محلول سود یا اسید کلریدریک 0/1 نرمال استفاده شد. قبل از افزودن دانه‌های خرد شده، آب تا دمای مورد نظر حرارت داده شد. مخلوط آب و دانه با استفاده از همزن شرکت شیمیفن ساخت کشور ایران با سرعت ثابت 1500 دور در دقیقه مخلوط گردید. برای ثابت نگه داشتن دما طی زمان استخراج، ظرف آب و دانه درون بن ماری شرکت

2 میلی‌لیتر محلول صمغ شنبلیله با غلظت‌های مختلف 0/05 تا 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر مخلوط شد. محلول حاصل به خوبی همزده و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول حاصل در طول موج 517 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر شرکت رایلی مدل یو وی 2601 ساخت کشور چین خوانده شد. اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. قدرت مهارکنندگی را دیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله (1) محاسبه شد.

$$(1) \text{ قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (درصد)} = (1 - As/Ac) \times 100$$

که در آن As جذب مخلوط DPPH و نمونه و Ac جذب شاهد است.

2-5-3- قدرت احیاء یون آهن سه ظرفیتی (FRAP)

قدرت احیاء یون آهن سه ظرفیتی به روش بنزی و همکاران اندازه گیری شد. به‌طور خلاصه 1/5 میلی‌لیتر محلول تازه FRAP با 50 میکرولیتر محلول صمغ شنبلیله با غلظت‌های مختلف 0/05 تا 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و 150 میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. پس از 8 دقیقه جذب این محلول در طول موج 593 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر شرکت رایلی مدل یو وی 2601 ساخت کشور چین خوانده شد. نمودار استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف 100-1000 میکرومولار $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ رسم گردید. نتیجه نهایی به‌صورت غلظت ترکیب ضد اکسایشی که قدرت احیاءکنندگی معادل 1 میکرومولار $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ دارد بیان شد [36].

2-5-2- قدرت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل

قدرت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل با استفاده از واکنش فنتون تعیین شد. 2 میلی‌لیتر محلول صمغ شنبلیله با غلظت‌های مختلف 0/05 تا 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر با 1/5 میلی‌لیتر محلول اورتوفنانترویلین 5 میلی‌مولار در اتانول، 1 میلی‌لیتر محلول پراکسید هیدروژن 1 درصد حجمی/حجمی، 1 میلی‌لیتر محلول سولفات آهن 7/5 میلی‌مولار و 4 میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سدیم 150 میلی‌مولار pH=7/4 به خوبی مخلوط شدند. محلول واکنش به مدت 1 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جذب محلول حاصل در طول موج 510 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر شرکت رایلی مدل یو وی 2601 ساخت کشور چین خوانده شد. اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. قدرت مهارکنندگی را دیکال هیدروکسیل با استفاده از معادله (2) محاسبه شد.

$$(2) \text{ قدرت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل (درصد)} = 1 - As/Ac \times 100$$

که در آن As جذب مخلوط واکنش حاوی نمونه و Ac جذب

2-6- طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش برای بررسی اثر متغیرهای مستقل شامل دما، زمان و نسبت آب به دانه بر متغیرهای پاسخ شامل راندمان، پروتئین، ویسکوزیته و کربوهیدرات کل از روش سطح پاسخ (RSM) و طرح مرکب مرکزی (CCD) استفاده شد. نتایج با استفاده از نرم افزار Design Expert ویرایش 8/0/7 تجزیه و تحلیل گردید. طرح آزمایش شامل سه فاکتور دما، زمان و نسبت آب به دانه به ترتیب هر کدام در محدوده 25-75 درجه سانتی‌گراد، 4-1 ساعت و 60-20 میلی‌لیتر بر گرم بود. متغیرهای مستقل و سطوح آن‌ها در طرح مرکب مرکزی در جدول (1) ارائه شده است. 20 نقطه آزمایش شامل 6 نقطه مرکزی برای ارزیابی تکرار پذیری روش اجرا گردید. شکل کلی رابطه چند جمله‌ای درجه دوم به صورت معادله (3) است:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i=2}^k \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + e_i \quad (3)$$

که در آن Y پاسخ، X_i و X_j متغیرهای مستقل، β_0 ضریب عرض از مبدا مدل، β_j ، β_{jj} و β_{ij} به ترتیب ضرایب خطی، متقابل و درجه دوم مدل و e_i خطای مدل هستند. برای ارزیابی کفایت برازش مدل چندجمله‌ای از ضریب تبیین (R^2)، ضریب تبیین اصلاح

افزودن متغیرهای مستقل در یک مدل، صرف نظر از معنی داری آماری آن‌ها، سبب افزایش ضریب تبیین می‌شود. بنابراین بالا بودن ضریب تبیین یک مدل لزوماً به معنی کفایت برازش مدل نیست. ضریب تبیین اصلاح شده در واقع اصلاح ضریب تبیین برای تعداد متغیرهای مستقل مدل نسبت به تعداد نقاط داده می‌باشد. در این پژوهش به استثنای پروتئین (0/79)، برای تمام پاسخ‌ها ضریب تبیین اصلاح شده بیش از 80 درصد بود که حاکی از عدم وجود عبارات فاقد معنی داری آماری در مدل‌ها است [37].

ضریب تغییرات یک مدل عبارت از نسبت جذر مجموع مربعات خطا به میانگین متغیر وابسته یا پاسخ می‌باشد و بیانگر میزان پراکنش داده هاست. مقدار کم ضریب تغییرات، کم‌تر از 10 درصد، نشانگر برازش بهتر مدل و کوچک بودن مقادیر باقی‌مانده نسبت به مقادیر پیش بینی شده و نزدیکی مقادیر پیش بینی شده به مقادیر واقعی است. مقادیر بالای ضریب تغییرات نشان می‌دهد که تغییرات در مقادیر میانگین به قدری بالاست که نمی‌توان یک مدل سطح پاسخ مناسب بر داده‌ها برازش نمود [38]. در پژوهش حاضر تمامی ضرایب تغییرات کم‌تر از 10 درصد بودند که بیانگر دقت و اعتبار آزمایشات است.

معنی دار شدن آماری آزمون عدم برازش نشانگر ضعف مدل در توصیف رابطه تابعی بین متغیرهای مستقل و متغیر پاسخ است. آزمون عدم برازش شاخص ضعف مدل توصیف کننده فضای داده‌های آزمایشی است که در آن، نقاط مشمول برازش نمی‌شوند یا تغییرات در مدل را نمی‌توان خطای تصادفی محسوب کرد [37]. در این پژوهش آزمون عدم برازش برای

شده (R^2_{adj})، عدم برازش (Lack of fit) و ضریب تغییرات (CV) استفاده شد. جهت تعیین نقطه بهینه روش عددی مورد استفاده قرار گرفت.

3- بحث و نتایج

3-1-1- برازش مدل

سه متغیر مستقل همراه با نقاط حداکثر، میانی و حداقل طرح سطح پاسخ به صورت مقادیر کد شده و واقعی در جدول (1) و طرح آماری به کار رفته در این پژوهش نیز در جدول (2) ارائه شده است.

مدل سطح پاسخ چند جمله‌ای درجه دوم بر هر یک از متغیرهای پاسخ برازش داده شد. نتایج آنالیز واریانس در جدول (3) نشان داد که مناسب ترین مدل برای تفسیر رفتار هر چهار متغیر پاسخ و پیش‌بینی داده‌های آزمایشی مدل درجه دوم بود. تجزیه رگرسیون برای برازش مدل و ارزیابی معنی داری آماری عبارات مدل مورد استفاده قرار گرفت. ضرایب رگرسیون مدل‌های چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیرهای پاسخ همراه با ضرایب تبیین (R^2)، ضرایب تبیین اصلاح شده (R^2_{adj}) و ضریب تغییرات (CV) در جدول (4) ارائه شده است.

ضریب تبیین مدل‌ها برای راندمان، ویسکوزیته، پروتئین و کربوهیدرات کل به ترتیب 0/98، 0/93، 0/84 و 0/91 به دست آمد که نشانگر برازش قابل قبول مدل‌ها بر داده‌های آزمایشی است. ضریب تبیین بیش از 80 درصد قابل قبول محسوب می‌شود [37]. به عبارت دیگر چنانچه بیش از 80 درصد واریانس در متغیرهای پاسخ به وسیله متغیرهای مستقل مدل توصیف شود، مدل قابل قبول خواهد بود.

جدول (1) متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده در طرح سطح پاسخ
Table 1 Independent variables and their levels used in the response surface design

کد و سطوح مربوطه Coded factor level			نماد ریاضی Symbol	واحد Unite	متغیر مستقل Independent variables
+1	0	-1			
75	50	25	A	°C	دما Temperature
4	2.5	1	B	h	زمان Time
60	40	20	C	ml/g	نسبت آب به دانه Water:seed

جدول (2) طرح مرکب مرکزی برای متغیرهای مستقل استخراج صمغ دانه شنبلیله

Table 2 Central composite design for the independent variables in fenugreek seed gum extraction

نسبت آب به دانه Water:seed (ml/g)	زمان Time (h)	دما Temperature (°C)	ترتیب اجرا Standard run	ترتیب استاندارد Standard order
(C)	(B)	(A)		
40	2.5	50	15	1
60	1	75	6	2
40	2.5	50	19	3
40	4	50	12	4
40	2.5	50	17	5
20	4	75	4	6
20	4	25	3	7
40	2.5	25	9	8
60	4	75	8	9
20	1	75	2	10
20	2.5	50	13	11
40	2.5	75	10	12
40	2.5	50	16	13
60	1	25	5	14
60	4	25	7	15
40	2.5	50	20	16
60	2.5	50	14	17
20	1	25	1	18
40	2.5	50	18	19
40	1	50	11	20

کم‌ترین تاثیر را بر راندمان استخراج داشته است. رابطه بین راندمان استخراج با متغیرهای مستقل به صورت دو به دو و در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل (1) نشان داده شده است. در شکل (1-a) دیده می‌شود با افزایش زمان استخراج از 1 به 4 ساعت و دمای استخراج از 25 به 75 درجه سانتی‌گراد در نسبت آب به دانه 40 راندمان استخراج از 2/37 درصد به 25/58 درصد افزایش یافت. با افزایش زمان استخراج، دانه‌ها بیش‌تر در معرض آب قرار می‌گیرند و با نفوذ بیش‌تر آب به درون دانه‌ها، انحلال صمغ و انتشار آن به درون آب شدت می‌گیرد [38]. در دماهای بالاتر ویسکوزیته صمغ متصل به دانه‌ها و چسبندگی دانه‌ها کاهش می‌یابد که در نتیجه استخراج صمغ آسان‌تر می‌گردد [39]. از سوی دیگر جوکی و همکاران نشان دادند که در دماهای بالاتر توانایی حلال برای انحلال ترکیبات افزایش و ویسکوزیته حلال کاهش می‌یابد که در نتیجه نفوذ حلال به درون دانه‌ها تسهیل می‌گردد [40].

تمام متغیرهای پاسخ از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$) که بیانگر صحت مدل در پیش بینی پاسخ هاست. نتایج تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیون مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیرهای پاسخ استخراج صمغ دانه شنبلیله (جدول 4)

3-2- راندمان

بر اساس مدل راندمان استخراج اثرات خطی دما و زمان استخراج بسیار معنی‌دار ($p < 0/01$) و اثر خطی نسبت آب به دانه نیز در سطح اطمینان 95 درصد معنی‌دار بود ($p < 0/05$) بود. از میان اثرات درجه دوم فقط اثر نسبت آب به دانه بسیار معنی‌دار ($p < 0/01$) به دست آمد (جدول 4). مطالعه اثرات متقابل نیز نشان دهنده معنی‌داری اثر متقابل دمای استخراج و نسبت آب به دانه بود. با توجه به مجموع مربعات می‌توان دریافت که دما و زمان استخراج بیش‌ترین و نسبت آب به دانه

جدول (3) آنالیز واریانس مدل‌های برازش یافته بر متغیرهای پاسخ استخراج صمغ دانه شنبليله
Table 3 Analysis of variance for the fitted models to the response variables of fenugreek seed gum extraction

کربوهیدرات کل Total carbohydrate (%)			پروتئین Protein (%)			ویسکوزیته Viscosity (mPas)			راندمان Extraction yield (%)			درجه آزادی DF	منابع Source
P-Value	F-Value	مجموع مربعات Sum of square	P-Value	F-Value	مجموع مربعات Sum of square	P-Value	F-Value	مجموع مربعات Sum of square	P-Value	F-Value	مجموع مربعات Sum of square		
005+ 1.016E		488.36			12195.87			4701.1			1	1	میانگین Mean
595.43	2.95	0.0643	4.52	3.33	0.0463	8.25	0.0015	394.59	<0.0001	15.68	345.47	3	خطی Linear
111.84	0.5	0.6872	3.07	3.19	0.0596	0.42	0.7445	22.35	0.4151	1.02	22.4	3	اثر متقابل Interaction
811.56	17.66	0.0003	2.24	3.88	0.0446	13.07	0.0009	185.48	<0.0001	31.37	85.94	3	درجه دوم Quadratic
16.54	0.18	0.9397	1.12	2.06	0.2043	0.43	0.7837	10.52	0.2212	1.95	5.16	4	درجه سوم Cubic
136.63		0.81			36.77			3.97			6	6	باقی مانده Residual
		500.12			12845.58			5164.05			20	20	کل Total

جدول (۴) نتایج تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیون مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیرهای پاسخ استخراج دانه شنبلیله

Table 4 ANOVA and regression coefficients of the second-order polynomial model for the response variables of fenugreek seed gum extraction

کربوهیدرات کل Total carbohydrate (%)		پروتئین Protein (%)		ویسکوزیته Viscosity (mPas)		راندمان (%) Extraction yield (%)		درجه	منابع				
P-Value	F-Value	مجموع مربعات Sum of square	ضریب Coefficient	P-Value	F-Value	مجموع مربعات Sum of square	ضریب Coefficient	P-Value	F-Value	مجموع مربعات Sum of square	ضریب Coefficient	آزادی DF	Source
0.0004	11.02	1518.83		0.0061	5.67	9.83		0.0001	14.15	602.42		9	مدل Model
0.0004	26.33	403.34	-6.35	0.0312	6.28	1.21	-0.35	0.0001	77.78	367.84	6.06	1	خطی Linear
0.0074	11.21	171.69	4.14	0.003	15.2	2.93	-0.54	0.155	2.37	11.19	-1.06	1	B
0.2752	1.33	20.41	1.43	0.1908	1.97	0.38	-0.19	0.0999	3.29	15.55	1.25	1	C
0.3432	0.99	15.17	-2.35	0.0649	4.3	0.83	0.55	0.5656	0.31	1.69	-0.78	1	A ²
0.0001	35.88	549.55	-14.14	0.7785	0.083	0.016	-0.076	0.002	17.28	81.74	5.45	1	B ²
0.0287	6.51	99.78	6.02	0.3889	0.81	0.16	0.24	0.0003	30.51	144.28	-7.24	1	C ²
اثر متقابل Interaction													
0.0276	6.63	101.57	-3.56	0.0221	7.33	1.41	-0.42	0.1162	2.96	13.99	-1.32	1	AB
0.4319	0.67	10.27	1.13	0.0166	8.26	1.59	0.45	0.3759	0.86	4.06	-0.71	1	AC
0.9954	3.44E-005	5.281E-004	8.125E-003	0.5762	0.34	0.066	0.091	0.3632	0.91	4.29	0.73	1	BC
0.0962	3.53	119.36		0.0618	4.51	1.58		0.8574	0.36	12.49		5	باقی مانده Residual
								0.225	7.07	8		5	عدم برازش Lack of fit
										34.8		5	خطای خالص Pure error
										649.71		19	کل Total

ادامه جدول (۴) نتایج تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیون مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیرهای پاسخ استخراج صمغ دانه شنبليله

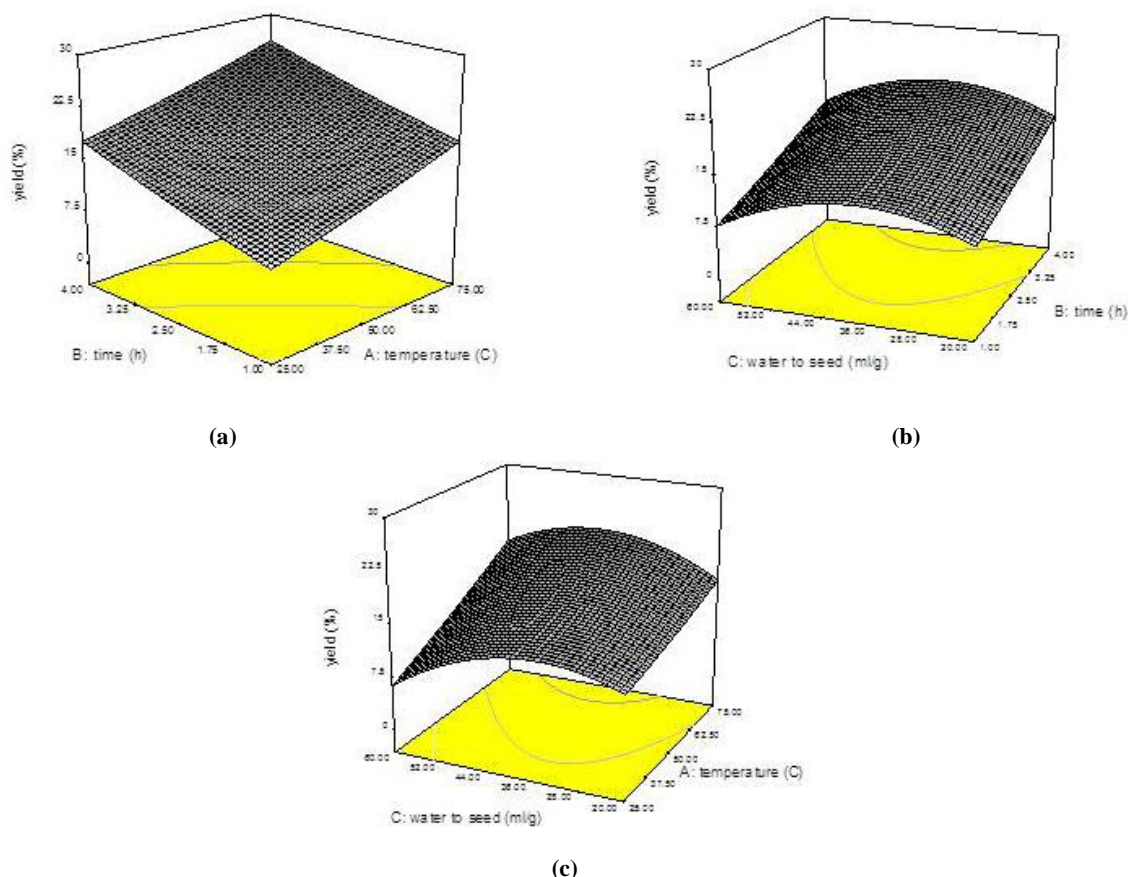
Table 4 ANOVA and regression coefficients of the second-order polynomial model for the response variables of fenugreek seed gum extraction

کربوهیدرات کل Total carbohydrate (%)		پروتئین Protein (%)		ویسکوزیته Viscosity (mPa.s)		راندمان (%) Extraction yield (%)		درجه	منابع
P-Value	F-Value	P-Value	F-Value	P-Value	F-Value	P-Value	F-Value	آزادی	Source
مجموع	مجموع	مجموع	مجموع	مجموع	مجموع	مجموع	مجموع	DF	
مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات		
Sum of	Sum of	Sum of	Sum of	Sum of	Sum of	Sum of	Sum of		
square	square	square	square	square	square	square	square		
0.9084	0.9084	0.8361	0.8361	0.9272	0.9272	0.9803	0.9803		ضریب تعیین R ²
0.8259	0.8259	0.7886	0.7886	0.8617	0.8617	0.9625	0.9625		ضریب تعیین اصلاح شده Adj R ²
5.49	5.49	8.89	8.89	8.81	8.81	6.23	6.23		ضریب تغییرات CV

افزایش مقدار آب به دانه شرایط لازم برای اسمز آب به درون دانه و انتشار صمغ به بیرون تسهیل می‌شود. تاثیر منفی نسبت‌های بیش‌تر آب به دانه بر راندمان استخراج توسط سینگ تانگ و همکاران در مورد صمغ برگ یانانگ و گاراژیان و همکاران در مورد صمغ دانه شاهی گزارش شده است [29، 42]. به نظر می‌رسد با افزایش بیش‌تر نسبت آب به دانه، تاثیر رقت سبب معکوس شدن فرایند اسمز آب و انتشار صمغ می‌گردد که در نتیجه کاهش راندمان استخراج را در پی خواهد داشت.

در پژوهش‌های مختلف راندمان پلی ساکاریدهای استخراج شده از دانه *Adenophorae radix* 5/78 درصد [44]، *Zizyphus* 13/96 درصد [45]، *lotus* 18/88 درصد [46]، *Cydonia oblonga* 10/59 درصد [46]، *Lepidium sativum* 6/46 درصد [42] و *perfoliatum* 17/36 درصد [39] گزارش شده است که همگی

به‌علاوه تاثیر معنی‌دار زمان و دمای استخراج بر راندمان را می‌توان به افزایش سرعت انتقال جرم پلی ساکاریدهای محلول تحت زمان استخراج طولانی و دمای بالا نسبت داد [41]. در تحقیقات متعدد مشخص شده است که افزایش زمان و دمای استخراج تا حد معین منجر به افزایش راندمان استخراج ترکیبات پلی ساکاریدی می‌گردد، هر چند الگوی این تاثیر بسته به نوع گیاه و ترکیب پلی ساکاریدی متفاوت است [29، 39 و 42]. چنان‌چه در اشکال (1-b) و (1-c) دیده می‌شود، در نقطه مرکزی متغیرهای زمان و دمای استخراج با افزایش نسبت آب به دانه تا حدود 40 میلی‌لیتر بر گرم ابتدا راندمان استخراج افزایش و سپس کاهش یافت. افزایش راندمان استخراج با افزایش نسبت آب به دانه تا 40 میلی‌لیتر بر گرم را می‌توان به وجود حلال بیش‌تر نسبت داد که نیروی محرکه برای انتقال جرم صمغ از دانه‌ها را تشدید می‌نماید [43]. به عبارت دیگر با



شکل (1) نمودارهای سطح پاسخ تاثیر متغیرهای استخراج صمغ دانه شنبلیله بر راندمان: (a) زمان- دما، (b) زمان- نسبت آب به دانه و (c) دما- نسبت آب به دانه

Fig. 1 Response surface for the effect of independent variables of fenugreek seed gum extraction on the yield: a) time-temperature, b) time-water to seed ratio, c) temperature-water to seed ratio

کاهش و پس از آن افزایش یافت. افزایش ویسکوزیته ظاهری در زمان‌های بالای استخراج را می‌توان همگام با افزایش راندمان استخراج تحت این شرایط دانست [29]. کوچکی و همکاران دریافتند که با افزایش زمان استخراج، ویسکوزیته ظاهری به صورت خطی کاهش می‌یابد [39]. بر اساس یافته‌های گارسیا و همکاران این اثر ناشی از تضعیف بر هم کنش‌های بین مولکولی با گذشت زمان و افزایش دمای استخراج است [4]. کاهش ویسکوزیته ظاهری از ساعت 1 تا 2/5 پس از استخراج در این پژوهش را می‌توان به غلبه اثر تضعیف بر هم کنش‌های بین مولکولی بر افزایش راندمان استخراج نسبت داد. اثر نسبت آب به دانه بر ویسکوزیته تا 40 میلی‌لیتر بر گرم افزایشی و پس از آن کاهش ارزیابی شد (شکل‌های 2-b و 2-c). این پدیده با تاثیر نسبت آب به دانه بر راندمان استخراج هماهنگ بود. یافته‌های مشابه در زمینه همسان بودن تاثیر نسبت آب به دانه بر راندمان و ویسکوزیته ظاهری در پژوهش‌های کوچکی و همکاران، وو و همکاران و سینگ تانگ و همکاران گزارش شده است [29، 41، 49].

بیشترین مقدار ویسکوزیته ظاهری برای صمغ استخراج شده در دمای 67/70 درجه سانتی‌گراد، زمان 1/08 ساعت و نسبت آب به دانه 40/20 میلی‌لیتر بر گرم معادل 36/65 میلی پاسکال ثانیه برآورد گردید.

3-4- پروتئین

مدل چند جمله‌ای درجه دوم پروتئین نشان دهنده معنی‌داری اثرات خطی دما و زمان استخراج بود ($p < 0/05$). در حالی که اثر خطی نسبت آب به دانه تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین نداشت ($p > 0/05$) (جدول 4). مطالعه اثرات متقابل نیز بیانگر معنی‌داری اثر متقابل دما و زمان استخراج و نیز دمای استخراج و نسبت آب به دانه بر میزان پروتئین بود. هیچ‌کدام از اثرات درجه دوم تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین استخراج شده نداشت ($p > 0/05$). از بین متغیرهای مستقل زمان استخراج بیشترین و نسبت آب به دانه کمترین تاثیر را بر میزان پروتئین استخراجی داشتند.

ارتباط میزان پروتئین با متغیرهای مستقل استخراج به صورت دو به دو و در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل (3)

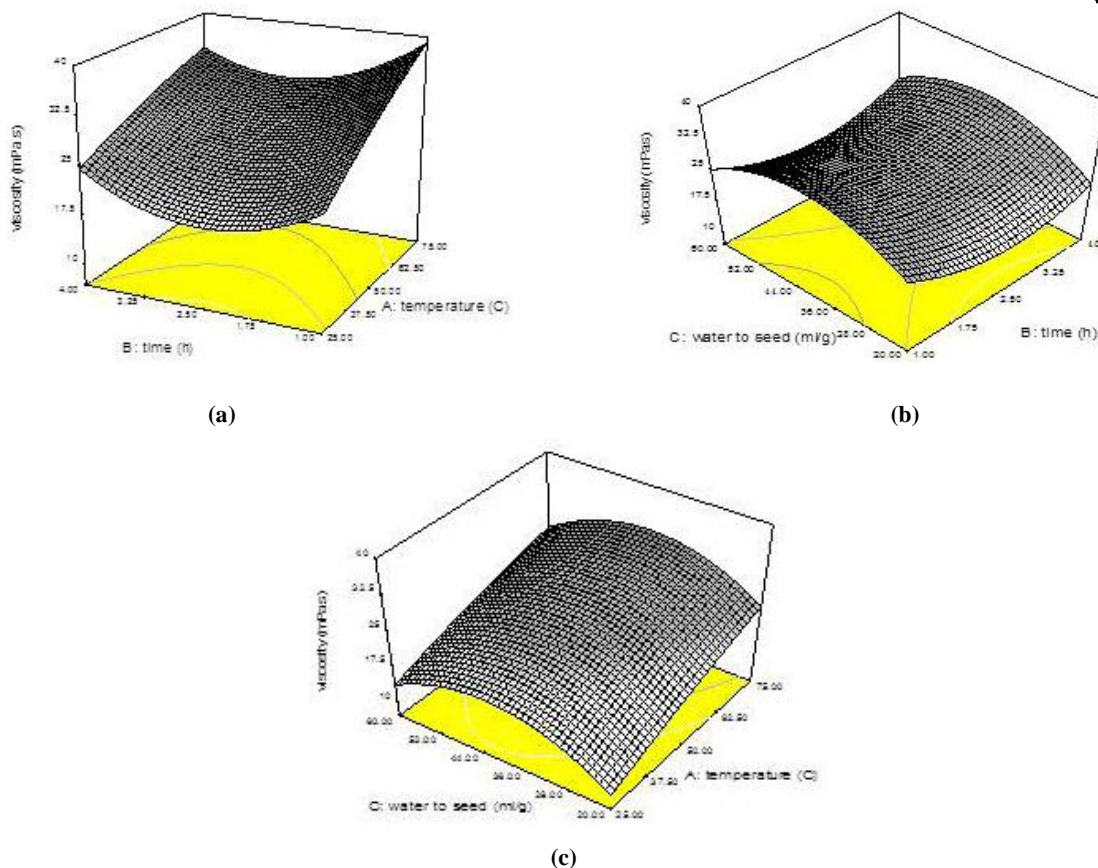
کم‌تر از راندمان استخراج دانه شنبلیله در این پژوهش می‌باشد. بنابراین از نقطه نظر اقتصادی صمغ دانه شنبلیله پتانسیل کاربرد در صنایع غذایی را دارد. راندمان استخراج صمغ از دانه شنبلیله در پژوهش‌های مختلف از 13/6 درصد [14] تا 22 درصد [5] تعیین شده است.

3-3- ویسکوزیته ظاهری

بر اساس داده‌های جدول (4) دمای استخراج تاثیر بسیار معنی‌داری ($p < 0/01$) بر ویسکوزیته ظاهری داشت. در حالی که اثرات خطی زمان استخراج و نسبت آب به دانه بر ویسکوزیته ظاهری معنی‌دار نبودند ($p > 0/05$). هم‌چنین اثرات درجه دوم زمان استخراج و نسبت آب به دانه بر ویسکوزیته ظاهری بسیار معنی‌دار ($p < 0/01$) ارزیابی شدند. ویسکوزیته ظاهری تحت تاثیر هیچ یک از اثرات متقابل متغیرهای مستقل قرار نگرفت. اهمیت تاثیر متغیرهای استخراج بر ویسکوزیته ظاهری به ترتیب دما بیشترین و زمان کمترین تعیین گردید.

رابطه بین ویسکوزیته ظاهری با متغیرهای مستقل استخراج به صورت دو به دو و در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل (2) نشان داده شده است. شکل (2-a) نشان می‌دهد که با افزایش دمای استخراج تا 75 درجه سانتی‌گراد ویسکوزیته ظاهری نیز افزایش می‌یابد. این افزایش ویسکوزیته در دماهای پایین‌تر استخراج با شیب بیشتری رخ داده است. تضعیف بر هم کنش بین ماکرومولکول‌ها در دمای بالا [48] و نیز تغییرات غیرقابل برگشت در کنفورماسیون [3] سبب کاهش ویسکوزیته در دماهای بالاتر استخراج می‌شود. این پدیده در پژوهش‌های مختلف مورد تایید قرار گرفته است [39، 42 و 49]. با این وجود پدیده افزایش ویسکوزیته در اثر افزایش دمای استخراج در این پژوهش را می‌توان با تاثیر افزایش دما بر راندمان استخراج صمغ هماهنگ دانست. دمای بالای استخراج منجر به راندمان بیش‌تر می‌شود که می‌تواند عامل ویسکوزیته بالا محسوب گردد. سینگ تانگ و همکاران در استخراج صمغ برگ گیاه یانانگ در مورد اثر دمای استخراج بر ویسکوزیته ظاهری به نتایج مشابهی دست یافتند [29].

چنانچه در شکل‌های (2-b) و (2-c) دیده می‌شود با افزایش زمان استخراج تا 2/5 ساعت ابتدا ویسکوزیته ظاهری



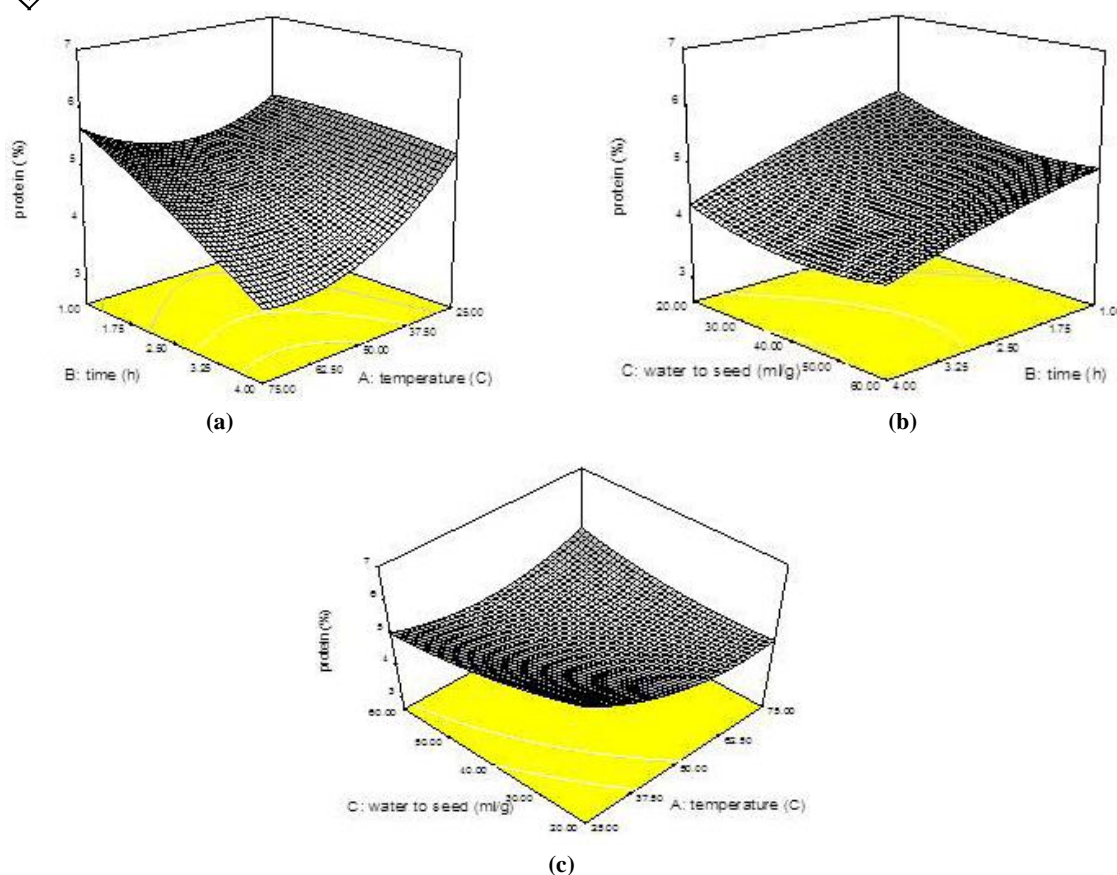
شکل (2) نمودارهای سطح پاسخ تاثیر متغیرهای استخراج صمغ دانه شنبلیله بر ویسکوزیته: (a) زمان - دما، (b) زمان - نسبت آب به دانه و (c) دما - نسبت آب به دانه

Fig. 2 Response surface for the effect of independent variables of fenugreek seed gum extraction on the apparent viscosity:

a) time-temperature, b) time-water to seed ratio, c) temperature-water to seed ratio

حرارتی پروتئین در منابع گیاهی مختلف دارد [27، 39، 52]. هر چند نسبت آب به دانه تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین صمغ استخراج شده نداشت ($p > 0/05$) اما با افزایش نسبت آب به دانه میزان پروتئین استخراج شده اندکی کاهش یافت (شکل‌های 3-b و 3-c). گزارشات چوی و همکاران، کوچکی و همکاران، گاراژیان و همکاران و طباطبایی عمید و همکاران متناقض با یافته‌های پژوهش حاضر بود [27، 39، 51، 52]. میزان پروتئین بر راندمان و کیفیت صمغ دانه شنبلیله تاثیر دارد. به استثنای صمغ‌هایی مانند صمغ عربی که در آن پروتئین در ساختار صمغ شرکت می‌کند، به‌طور کلی میزان پروتئین کمتر نشانگر خلوص بیشتر صمغ استخراج شده است. کم‌ترین مقدار پروتئین در دمای 69/6 درجه سانتی‌گراد، زمان 4 ساعت و نسبت آب به دانه 32/18 میلی‌لیتر بر گرم به میزان

نشان داده شده است. چنان‌چه در شکل (3-a) دیده می‌شود به‌طور کلی با افزایش دما و زمان استخراج میزان پروتئین کاهش می‌یابد. به‌ویژه این کاهش در دمای استخراج 75 درجه سانتی‌گراد با شیب بیش‌تری رخ داد. این پدیده را می‌توان به دناتوراسیون حرارتی پروتئین و کاهش قابلیت انحلال آن در دما و زمان بالای استخراج نسبت داد. کاهش میزان پروتئین در دماهای بالای استخراج توسط جوکی و همکاران در مورد موسیلاژ دانه به و طباطبایی عمید و همکاران در مورد صمغ دانه *Durio zibethinus* نیز گزارش شده است [40، 51]. هر چند کوچکی و همکاران، چوی و همکاران، گاراژیان و همکاران نشان دادند با افزایش دمای استخراج و به دلیل تسهیل فرایند انتقال جرم میزان پروتئین افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد این تفاوت رفتار بستگی به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و به خصوص



شکل (3) نمودارهای سطح پاسخ تاثیر متغیرهای استخراج صمغ دانه شنبلیله بر پروتئین: (a) زمان - دما، (b) زمان - نسبت آب به دانه و (c) دما - نسبت آب به دانه

Fig. 3 Response surface for the effect of independent variables of fenugreek seed gum extraction on the protein content:

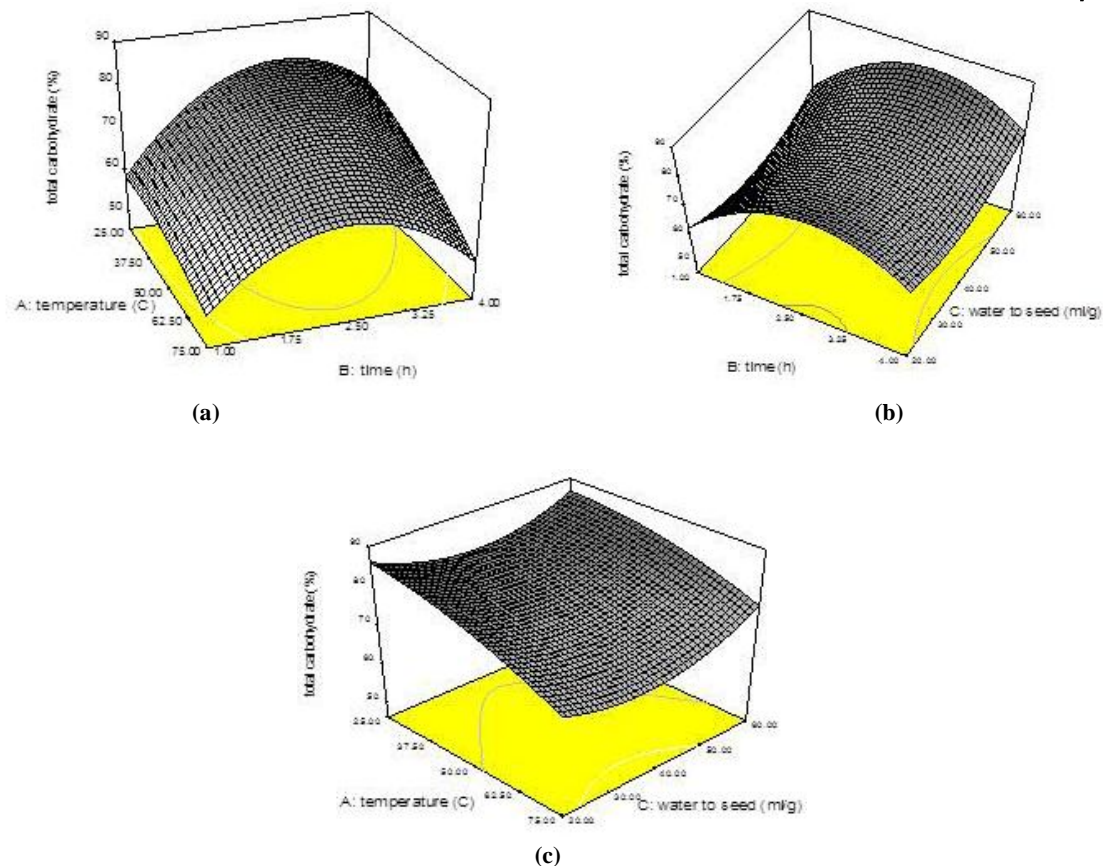
a) time-temperature, b) time-water to seed ratio, c) temperature-water to seed ratio

3/64 درصد تعیین گردید. این مقدار پروتئین در محدوده اعداد گزارش شده برای صمغ دانه *L.perfoliatum* توسط کوچکی و همکاران 2/74 درصد، صمغ دانه ریحان توسط کاراسیا و همکاران 2/17 درصد، صمغ دانه کهور توسط استوز و همکاران 2/5 درصد، صمغ تارا توسط گلیکزمن 3/13 درصد، پکتین *Krueo Ma Nuy* توسط سینگ تانگ و همکاران 3/29 درصد و صمغ دانه شنبلیله توسط برامر و همکاران 2/36 درصد است [3, 5, 29, 39, 53].

3-5- کربوهیدرات کل

رابطه بین کربوهیدرات کل با متغیرهای مستقل استخراج به صورت دو به دو و در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل (4) نشان داده شده است. همان طور که در شکل (4-a) دیده می شود با افزایش دما و زمان استخراج تا 50 درجه سانتی گراد و 2/5 ساعت میزان کربوهیدرات کل استخراج شده ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. افزایش میزان کربوهیدرات کل

بر اساس آنچه در جدول (4) نشان داده شده است، دما و زمان استخراج تاثیر بسیار معنی داری ($p < 0/01$) بر میزان کربوهیدرات کل استخراج شده داشت. هم چنین اثر درجه دوم



شکل (4) نمودارهای سطح پاسخ تاثیر متغیرهای استخراج صمغ دانه شنبلیله بر کربوهیدرات کل: (a) زمان- دما، (b) زمان- نسبت آب به دانه و (c) دما- نسبت آب به دانه

Fig. 4 Response surface for the effect of independent variables of fenugreek seed gum extraction on the total carbohydrate:

a) time-temperature, b) time-water to seed ratio, c) temperature-water to seed ratio

تغییر می‌کند. این تغییرات برای تنظیم ویژگی‌های ساختاری غشاء در راستای ایفای وظایف فیزیولوژیکی است. آشفته‌گی‌های ساختاری همانند جدایی فاز اجزاء تشکیل دهنده غشاء منجر به آشفته‌گی‌های عملکردی از جمله تغییر ویژگی‌های انتقالی و تراوایی انتخابی غشا می‌گردد [58].

نسبت آب به دانه هر چند تاثیر معنی‌داری بر میزان کربوهیدرات کل نداشت ($p > 0/05$)، اما به‌طور کلی با افزایش نسبت آب به دانه میزان کربوهیدرات کل افزایش یافت. این افزایش استخراج کربوهیدرات کل به‌دلیل میزان حلال بیشتر می‌باشد که پدیده انتشار پلی ساکاریدها از دانه به خارج را تسهیل می‌نماید.

بر عکس پروتئین، میزان بیش‌تر کربوهیدرات کل نشانه موفق بودن فرایند استخراج و خلوص بیش‌تر صمغ استخراج

استخراج شده تحت تاثیر دما را می‌توان به قابلیت انحلال بیش‌تر پلی ساکارید در آب، ضریب انتشار بالاتر پلی ساکارید و بهبود فرایند انتقال جرم در دماهای بالاتر نسبت داد [55]. کاهش میزان کربوهیدرات استخراج شده در دماهای بالاتر از حدود 50 درجه سانتی‌گراد توسط برخی پژوهشگران از جمله چن و همکاران، مزارعی و همکاران و یانگ و همکاران گزارش شده است [55-57]. محققین مذکور این پدیده را به تجزیه و تخریب ساختار پلی ساکاریدها نسبت دادند. هر چند این توجیه چندان منطقی به نظر نمی‌رسد. احتمالاً تغییر در فرایندهای انتقال و تراوایی انتخابی غشاهای سیتوپلاسمی دلیل اصلی این پدیده محسوب می‌شود. غشاهای سیتوپلاسمی در گیاهان از لیپید و پروتئین تشکیل یافته است. ترکیب غشاء، به‌خصوص جزء چربی، در پاسخ به شرایط محیطی به‌ویژه دما

شده است. در این پژوهش بیشترین مقدار کربوهیدرات کل 86/892 درصد تحت شرایط دمایی استخراج 28/61 درجه سانتی‌گراد، زمان 2/81 ساعت و نسبت آب به دانه 58/85 میلی‌لیتر بر گرم به دست آمد.

3-6- بهینه سازی و اعتبارسنجی

شرایط بهینه استخراج صمغ دانه شنبلیله برای دستیابی به حداکثر راندمان، ویسکوزیته، کربوهیدرات کل و حداقل پروتئین تعیین گردید. بهینه سازی عددی با حل ماتریکس معکوس معادله رگرسیون چند جمله‌ای به کمک نرم افزار Design Expert ویرایش 8/0/7 انجام گردید. دما و زمان استخراج و نسبت آب به دانه به ترتیب در محدوده 25-75 درجه سانتی‌گراد، 1-4 ساعت و 20-60 میلی‌لیتر بر گرم انتخاب گردید. شرایط بهینه فرایند استخراج در جدول (5) ارائه شده است. این شرایط منجر به حداکثر راندمان استخراج 21/18 درصد، ویسکوزیته 29/06 میلی پاسکال ثانیه و کربوهیدرات کل 70/98 درصد و کمترین مقدار پروتئین 4/19 درصد گردید.

3-7- ویژگی‌های ضد اکسایشی

3-7-1- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

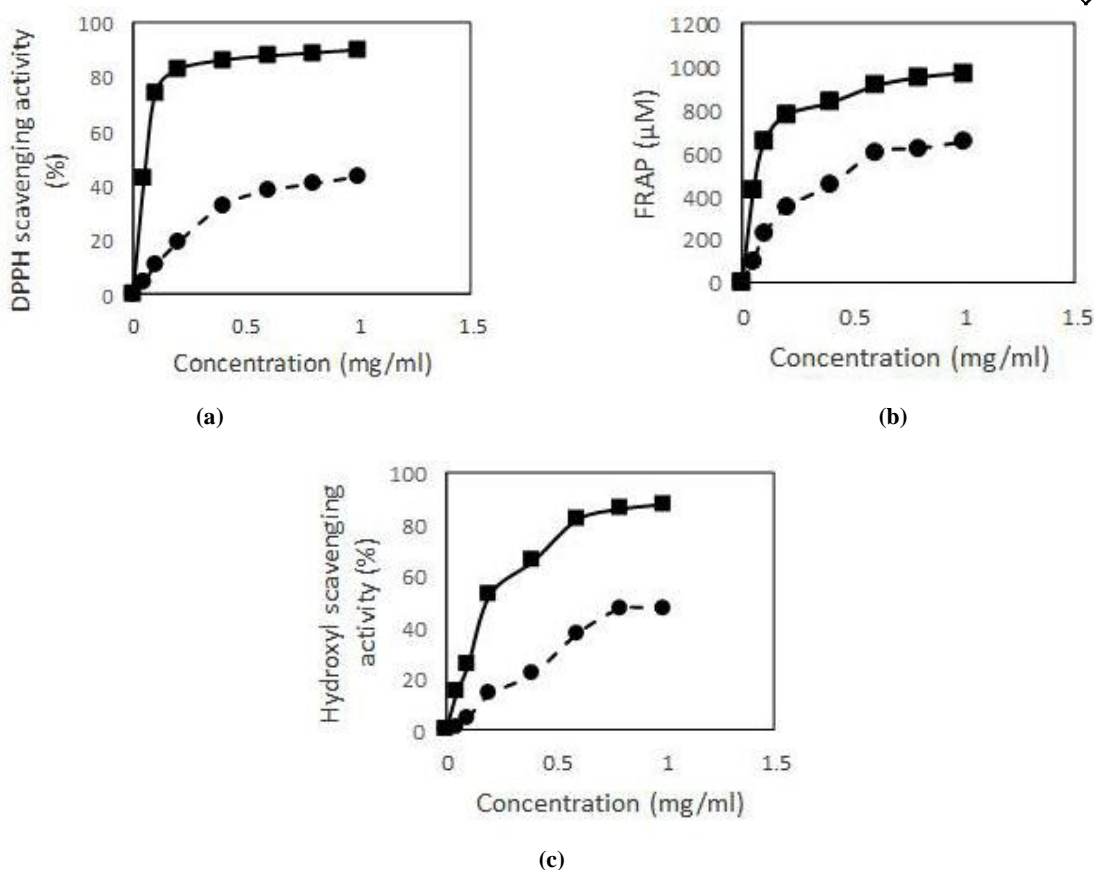
2 و 2-دی فنیل 1-پیکریل هیدرازیل (DPPH) یک رادیکال آزاد پایدار است که به طور گسترده برای ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط ترکیبات ضد اکسایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. حداکثر جذب محلول اتانولی DPPH در طول موج 517 نانومتر قرار دارد. DPPH در اثر مواجهه با ترکیبات الکترون یا هیدروژن دهنده مانند ترکیبات ضد اکسایشی مهار می‌شود و در نتیجه جذب در طول موج 517 نانومتر کاهش می‌یابد [59]. هر چه میزان جذب مخلوط محلول‌های ترکیب مورد نظر و DPPH در طول موج 517 نانومتر کم‌تر باشد، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH آن ترکیب بالاتر خواهد بود. فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH صمغ دانه شنبلیله و اسیدآسکوربیک در شکل (5-a) ارائه شده است. نتایج نشان داد که صمغ دانه شنبلیله و اسیدآسکوربیک هر دو دارای قدرت مهار رادیکال DPPH بودند و فعالیت مهارکنندگی وابسته به غلظت بود. در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش در محدوده 0-1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت مهارکنندگی اسیدآسکوربیک به طور بسیار معنی دار ($p < 0/01$) بیش‌تر از صمغ دانه شنبلیله تعیین گردید، به گونه‌ای که در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت مهار کنندگی اسید آسکوربیک معادل 90/05 درصد و صمغ دانه شنبلیله حدود 50 درصد آن و معادل 43/23 درصد تعیین گردید. تحقیقات اخیر نشان داده است که ترکیباتی مانند گلوکوتایون، اسیدآسکوربیک، ترکیبات

3-6- بهینه سازی و اعتبارسنجی

برای اعتبارسنجی مدل پیش بینی پاسخ‌های بهینه، با استفاده از شرایط بهینه، فرایند استخراج با دو تکرار دوباره انجام شد. میانگین مقادیر واقعی پاسخ‌ها برای راندمان، ویسکوزیته، کربوهیدرات کل و پروتئین به ترتیب 22/81 درصد، 33/53 میلی پاسکال ثانیه، 75/12 درصد و 4/39 درصد به دست آمد. انجام آزمون تی استیودنت نشان داد بین مقادیر پیش بینی شده و مقادیر واقعی پاسخ‌ها اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0/05$). بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که مدل‌های به دست آمده به خوبی قادر به پیش بینی شرایط

جدول (5) پیش بینی نقاط بهینه برای استخراج صمغ دانه شنبلیله
Table 5 Prediction of the optimal conditions of fenugreek seed gum extraction

بیش‌ترین Highest	بهینه Optimum	کم‌ترین Lowest	فاکتور Factor
75	60.71	25	دما Temperature (°C)
4	3.33	1	زمان Time (h)
60	44.6	20	نسبت آب به دانه Water:seed (ml/g)



شکل (5) اثرات ضد اکسایشی صمغ دانه شنبلیله: قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH: (a) قدرت احیا آهن سه ظرفیتی، (b) قدرت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل و (c) صمغ شنبلیله (●) اسید آسکوربیک (■)

Fig. 5 Antioxidation effects of fenugreek seed gum: DPPH free radical scavenging ability: a) Ferric reduction ability, b) Hydroxyl radical scavenging ability, c) Fenugreek gum (●), Ascorbic acid (■)

خالص ناشی از حضور تعداد زیاد گروه هیدروکسیل در مولکول پلی ساکارید است که می‌تواند به‌عنوان دهنده الکترون عمل نماید و الکترون به رادیکال DPPH منتقل نماید [61]. هم‌چنین چن و همکاران نشان دادند که ویژگی ضد اکسایشی *Ganoderma atrum* می‌تواند ناشی از ترکیب آن با رادیکال آزاد و ختم واکنش‌های رادیکالی زنجیره‌ای اکسایشی باشد [62]. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که کاربرد صمغ دانه شنبلیله در فرمولاسیون مواد غذایی می‌تواند ظرفیت ضد رادیکالی آن را افزایش دهد و نیمه عمر ترکیبات ضد اکسایشی طبیعی را بهبود بخشد. با وجود این تعیین مکانیسم دقیق فعالیت پروتون دهنده پلی ساکارید نیازمند انجام مطالعات بیشتر است.

پلی هیدروکسی آروماتیک و آمین‌های آروماتیک می‌توانند بر اساس قابلیت احیا و دادن هیدروژن به رادیکال آزاد DPPH آن را بی‌رنگ نمایند [59]. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً صمغ دانه شنبلیله به‌واسطه دادن اتم هیدروژن یا انتقال الکترون می‌تواند رادیکال DPPH را مهار نماید و واکنش‌های رادیکالی زنجیره‌ای را خاتمه دهد. به‌علاوه گزارش شده است فعالیت ضد اکسایشی پلی ساکارید با وزن مولکولی، میزان اسیداورونیک، درجه سولفات‌شدن، پیوندهای گلیکوزیدی مرتبط است [44]. لو و همکاران قدرت مهار رادیکال آزاد پلی ساکارید محلول در آب *Dendrobium officinale* را به وجود گروه‌های کربوکسیل نسبت دادند [60]. از سوی دیگر گائو و همکاران بیان کردند ظرفیت ضد اکسایشی پلی ساکاریدهای

این محققین قدرت احیاکنندگی قابل توجه این ترکیب پلی ساکاریدی را به حضور مقادیر بالای اسیداورونیک نسبت دادند. تان و همکاران قدرت احیاکنندگی قابل توجه پلی ساکارید حاصل از ریشه گیاه *Dipsacus asperoides* را به حضور گروه‌های هیدروکسیل در ساختار پلی ساکارید نسبت دادند که می‌تواند در احیا Fe^{3+} به Fe^{2+} شرکت نماید [63].

3-7-3- قدرت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل

رادیکال هیدروکسیل جزء فعال‌ترین رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود که به سهولت از غشا سلول عبور کرده و با ماکرومولکول‌ها شامل کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و DNA واکنش داده و سبب بروز پیری زودرس، سرطان و سایر بیماری‌ها می‌شود [64]. بنابراین مهار رادیکال هیدروکسیل در راستای حفاظت سلول و نیز سیستم‌های غذایی امری ضروری است. بر اساس یافته‌های کی و همکاران توانایی مهار، ناشی از مهار مستقیم نیست، بلکه به دلیل مهار تولید رادیکال آزاد هیدروکسیل به وسیله چلات کردن یون‌هایی نظیر Fe^{2+} و Cu^{2+} است [65]. رادیکال هیدروکسیل در نتیجه واکنش Fe^{2+} و H_2O_2 تولید می‌شود و پلی ساکاریدها در نتیجه چلات کردن Fe^{2+} می‌توانند سبب کاهش تولید رادیکال هیدروکسیل شوند [61]. هر چند بر اساس نظر چنگ و همکاران مهار کننده‌های رادیکال هیدروکسیل با یون‌های آهن دو ظرفیتی (Fe^{2+}) برای رادیکال هیدروکسیل حاصل رقابت می‌کنند و در نتیجه تشکیل رنگ را کاهش می‌دهند [66].

نتایج حاصل از فعالیت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل صمغ دانه شنبلیله و اسیدآسکوربیک در شکل (5-c) ارائه شده است. در محدوده غلظت 0/05 تا 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بین غلظت صمغ دانه شنبلیله و فعالیت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل همبستگی مثبت وجود داشت. در تمام نقاط غلظت، قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل اسیدآسکوربیک به‌طور بسیار معنی‌داری ($p < 0/01$) بالاتر از صمغ دانه شنبلیله بود. با افزایش غلظت از 0/05 تا 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل برای صمغ دانه شنبلیله از 0/91 تا 46/95 درصد و برای اسیدآسکوربیک از 14/83 تا 87/91 درصد افزایش یافت. فعالیت مهار کنندگی صمغ دانه

3-7-2- قدرت احیا کنندگی یون آهن سه ظرفیتی (FRAP)

آزمون FRAP بر اساس توانایی ترکیبات ضد اکسایشی برای احیا Fe^{3+} به Fe^{2+} در حضور TPTZ¹ می‌باشد که در نتیجه کمپلکس آبی رنگ Fe^{2+} -TPTZ تشکیل می‌گردد. این کمپلکس در طول موج 593 نانومتر دارای جذب حداکثر است. مقدار جذب نشانگر قدرت احیاکنندگی ترکیب ضد اکسایشی می‌باشد [36]. ظرفیت احیاکنندگی یک ترکیب شاخص مهمی از فعالیت ضد اکسایشی آن است.

چنانچه در شکل (5-b) دیده می‌شود، با افزایش غلظت از 0/05 به 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، مقادیر FRAP برای اسیدآسکوربیک از 425/85 به 970/35 میکرومولار و برای صمغ دانه شنبلیله از 96/48 به 650/76 میکرومولار افزایش یافت. در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش قدرت احیاکنندگی اسیدآسکوربیک به‌طور بسیار معنی‌داری ($p < 0/01$) بیش‌تر از صمغ دانه شنبلیله بود. در غلظت 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر قدرت احیاکنندگی صمغ دانه شنبلیله 67 درصد اسیدآسکوربیک ارزیابی گردید. در پژوهش‌های متعدد گزارش شده است که پلی‌ساکاریدهای حاصل از منابع گیاهی دارای قدرت احیاکنندگی قابل توجهی می‌باشند. به گونه‌ای که در برخی پژوهش‌ها حتی فعالیت احیاکنندگی بیش‌تر از BHT گزارش شده است [45]. لی و همکاران نشان دادند با افزایش غلظت پلی ساکارید حاصل از ژوژوبا از 0/5 به 2/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر مقدار FRAP از حدود 200 به 500 میکرومولار افزایش یافت [58]. هم‌چنین حامی و همکاران قدرت احیاکنندگی محلول 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پلی ساکارید حاصل از میوه *Zizyphus lotus* را معادل 614/39 میکرومولار تعیین کردند [46]. زو و همکاران در بررسی ویژگی‌های ضد اکسایشی پلی ساکارید حاصل از *Pteridium aquilinum* نشان دادند که با افزایش غلظت از 25 به 400 میکروگرم در میلی‌لیتر، قدرت احیاکنندگی این ترکیب از حدود 200 به 600 میکرومولار افزایش یافت [23]. در پژوهش دیگر مشخص شد پلی ساکارید استخراجی از پوست نارنگی دارای قدرت احیاکنندگی بسیار بالایی است به گونه‌ای که محلول با غلظت 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آن دارای مقدار FRAP معادل 3662/9 میکرومولار بود [56].

4- نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های فوق می‌توان نتیجه گرفت که راندمان استخراج صمغ دانه شنبلیله به سبب بهینه‌سازی متغیرهای موثر در فرایند استخراج به‌طور چشمگیری افزایش یافت. بیش‌ترین راندمان استخراج معادل 22/81 درصد به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با مقدار راندمان پیش‌بینی شده (21/18 درصد) تحت شرایط بهینه استخراج شامل دمای 60/71 درجه سانتی‌گراد، زمان 3/33 ساعت و نسبت آب به دانه 44/6 میلی‌لیتر بر گرم نداشت. به‌علاوه بررسی فعالیت ضد اکسایشی صمغ دانه شنبلیله به روش‌های قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی یون آهن سه ظرفیتی و قدرت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل در نقطه بهینه نشان داد که این صمغ در مقایسه با اسید آسکوربیک دارای قدرت ضد اکسایشی قابل قبولی است.

شنبلیله در غلظت 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حدود 53/5 درصد اسیدآسکوربیک ارزیابی گردید. قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل پلی‌ساکاریدها را می‌توان به ترکیبی از اثرات قدرت احیاکنندگی، قدرت دهندگی اتم‌های هیدروژن و مهار اکسیژن فعال نسبت داد [65]. مکانیسم احتمالی برای توانایی مهار پلی‌ساکاریدها را با تعداد گروه‌های هیدروکسیل فعال مرتبط می‌دانند. افزایش استخلافات الکترون دهنده سبب افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد می‌شود. زیرا منجر به افزایش دانسیته الکترون روی حلقه هتروسیکلیک کربن‌ها می‌گردد. فعالیت پایین مهارکنندگی را می‌توان به تشکیل پیوندهای هیدروژنی درون و بین مولکولی نسبت داد که مانع از واکنش‌پذیری گروه‌های هیدروکسیل در زنجیره پلیمری می‌گردد [66]. پژوهش‌های مختلف قدرت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل توسط پلی‌ساکارید استخراجی از *Bruguiera gymnorrhiza* [68]، پوست نارنگی *Cyclina sinensis* [61] را به اثبات رسانده است.

منابع

- pp 1-18.
- [5] Brummer, Y., Cui, W., Wang, W. (2003). Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. *Food Hydrocolloid.*, 17, 229-236.
- [6] Robinson, G., Ross-Murphy, S. B., Morris, E. R. (1982). Viscosity-molecular weight relationship, intrinsic chain flexibility and dynamic solution properties of guar galactomannan. *Carbohydr. Res.*, 107, 17-32.
- [7] Pauly, M., Freis, O., Pauly, G. (1999). Galactomannan and xyloglucan: bioactive polysaccharides. *Cosmet. Toiletries.*, 114, 65-78.
- [8] Valenga, F., Lucysyn, N., Ono, L., de Souza, C. F., Lubambo, A., Sierakowski, M. (2011). Galactomannan-Alginate synergism applied in albumin encapsulation. In: *Macromolecular Symposia.* (pp. 99-106) WILEY-VCH Verlag.
- [1] Williams, P. A., Phillips, G. O. (2000). Introduction to food hydrocolloids, in: Williams, P. A., Phillips, G. O. (Eds.) *Handbook of hydrocolloids*, CRC Press, New York, pp1-19.
- [2] Meier, H., Reid, J. S. G. (1982). Reserve polysaccharides other than starch in higher plants, in: Loewus, F. A., Tanner, W. (Eds.) *Encyclopaedia of Plant Physiology*, Springer, Berlin, pp 418-471.
- [3] Estévez, A. M., Saenz, C., Hurtado, M. L., Escobar, B., Espinoza, S., Suarez, C. (2004). Extraction methods and some physical properties of mesquite (*Prosopis chilensis Stuntz*) seed gum. *J. Sci. Food Agr.*, 84, 1487-1492.
- [4] Stephen, A. M., Churms, S. C. (1995). Introduction, in: Stephen, A. M., Churms, S. C. (Eds.), *Food polysaccharides and their application*, CRC Press, New York,

- [18] Witschi, H. P. (1986). Enhanced tumour development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 1127-1130.
- [19] Grice, H. C. (1988). Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem. Toxicol.*, 26, 717-723.
- [20] Kardošová, A., Machova, E. (2006). Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia.*, 77, 367-373.
- [21] Wang, Q., Sun, Y., Yang, B., Wang, Z., Liu, Y., Cao, Q., Kuang, H. (2014). Optimization of polysaccharides extraction from seeds of *Pharbitis nil* and its antioxidant activity. *Carbohydr. polym.*, 102, 460-466.
- [22] Ge, Q., Huang, J., Mao, J. W., Gong, J. Y., Zhou, Y. F. and Huang, J. X. (2014). Optimization of total polysaccharide extraction from *Herba lophatheri* using RSM and antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.*, 67, 37-42.
- [23] Zou, C., Du, Y. M., Li, Y., Yang, J. H., Feng, T., Zhang, L., Kennedy, J. F. (2008). Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity in vitro. *Carbohydr. Polym.*, 73, 322-331.
- [24] Srinivasan, K. (2006). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects. *Food Rev. Int.*, 22, 203-224.
- [25] Hannan, J. M. A., Ali, L., Rokeya, B., Khaleque, J., Akhter, M., Flatt, P. R., Abdel-Wahab, Y. H. A. (2007). Soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. *Brit. J. Nutr.*, 97, 514-521.
- [26] Amin, A. M., Ahmad, S. A., Yin Yin, Y., Yahaya, N., Ibrahim, N. (2007). Extraction, purification and
- [9] Cerqueira, M.A., Bourbon, A.L., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicent, A.A. (2011). Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends Food Sci. Tech.*, 22, 662-671.
- [10] Kapoor, V. P., Pandey, K., Khanna, M., Dwiredi, A. K., Singh, S. (1999). Pharmaceutical applications of the galactomannan from the seeds of *Cassia javanica* Linn. *Trends Carbohydr. Chem.*, 5, 61-69.
- [11] Cruz Alcedo, G. E. (1999). Production and characterisation of prosopis seed galactomannan, PhD Thesis, *Swiss Federation Institute of Technology, Zurich. Food Eng.*, 77, 295-30.
- [12] Jiang, J.X., Zhu, L.W., Zhang, W.M., Sun, R.C. (2007). Characterization of galactomannan gum from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and its rheological properties. *Int. J. Polym. Mater.*, 56, 1145-1154.
- [13] Srichamroen, A., Vasanthan, T., Ooraikul, B., Basu, T. K. (2005). Isolation of galactomannan from fenugreek seeds. In: *2005 IFT Annual Meeting*. (pp. 245-254) New Orleans, Louisiana, USA.
- [14] Andrews, P., Hough, L., Jones, J. K. N. (1952). Mannose-containing polysaccharides. Part 1. The galactomannan of fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*). *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2744-2750.
- [15] Tiwari, A. K. (2004). Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Curr. Sci. India*, 86, 1092-1102.
- [16] Cadenas, E., Davies, J. A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Bio. Med.*, 29, 222-230.
- [17] Sarma, A. D., Anisur, R. M., Ghosh, A. K. (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Int. J. Pharma Sci. Res.*, 1, 185-192.

- of the polysaccharides of Chuanminshen violaceum. *Carbohydr. Polym.*, 157, 629-636.
- [36] Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 23, 70-76.
- [37] Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, New York
- [38] Ye, C. L., Jiang, C. J. (2011). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica L.* by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.*, 84, 495-502.
- [39] Koocheki, A., Mortazavi, S. A., Shahidi, F., Razavi, S. M. A., Taherian, A. R. (2009). Rheological properties of mucilage extracted from *Alyssum homolocarpum* seed as a new source of thickening agent. *J. Food Eng.*, 91, 490-496.
- [40] Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., Koocheki, A. (2014). Optimization of extraction, antioxidant activity and functional properties of quince seed mucilage by RSM. *Int. J. Biol. Macromole.*, 66, 113-124.
- [41] 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 Chem.*, 105, 1599-1605.
- [42] Karazhiyan, H., Razavi, S. M. A., Phillips, G. O. (2011). Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloid.*, 25, 915-920.
- [43] Bendahou, A., Dufresne, A., Kaddami, H., Habibi, Y. (2007). Isolation and structural characterization of hemicelluloses from palm of *Phoenix dactylifera L.* *Carbohydr. Polym.*, 68, 601-608.
- characterization of durian seed gum. *Food Hydrocolloid.*, 21, 273-279.
- [27] Cui, W., Mazza, G. (1996). Physicochemical characteristics of flaxseed gum. *Food Res. Int.*, 29, 397-402.
- [28] Sav, A. J., Meer, T. A., Fule, R. A., Amin, P. D. (2014). Investigational studies on highly purified fenugreek gum as emulsifying agent. *J. Disper. Sci. Technol.*, 34, 657-662.
- [29] Singthong, J., Ningsanond, S., Cui, S. W. (2009). Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chem.*, 114, 1301-1307.
- [30] Razavi, S. M. A., Mortazavi, S. A., Matia-Merino, L., Hosseini-Parvar, S. H., Motamedzadegan, A., Khanipour, E. (2009). Optimization study of gum extraction from Basil seeds (*Ocimum basilicum L.*). *Int. J. Food Sci. Tech.*, 44, 1755-1762.
- [31] AOAC. (1995). *Official methods of analysis*. Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- [32] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- [33] 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 Hydrocolloid.*, 23, 2369-2379.
- [34] Shen, S., Chen, D., Li, X., Li, T., Yuan, M., Zhou, Y., Ding, C. (2014). Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla*. *Carbohydr. Polym.*, 104, 80-86.
- [35] Fan, J., Feng, H., Yu, Y., Sun, M., Liu, Y., Li, T., Sun, X., Liu, S., Sun, M. (2017). Antioxidant activities

- O. (2011). Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloid.*, 25, 915-920.
- [53] Chaurasia, M., Chourasia, M. K., Jain, N. K., Jain, A., Soni, V., Gupta, Y., Jain, S. K. (2008). Cross-linked guar gum microspheres: A viable approach for improved delivery of anticancer drugs for the treatment of colorectal cancer. *Aaps Pharmscitech.*, 7, 143.
- [54] Glicksman, M. (1982). *Food hydrocolloids*, CRC Press, New York.
- [55] Chen, R., Jin, C., Tong, Z., Lu, J., Tan, L., Tian, L., Chang, Q. (2016). Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels. *Carbohydr. Polym.*, 136, 187-197.
- [56] Mazarei, F., Jooyandeh, H., Noshad, M., Hojjati, M. (2017). Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa* L.) leaf: extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 95, 224-231.
- [57] Yang, S., Li, Y., Jia, D., Yao, K., Liu, W. (2017). The synergy of Box-Behnken designs on the optimization of polysaccharide extraction from mulberry leaves. *Ind. Crop Prod.*, 99, 70-78.
- [58] Quinn, P. J. (1998). Effects of temperature on cell membranes. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 42, 237-258.
- [59] Li, J., Ai, L., Hang, F., Ding, S., Liu, Y. (2014). Composition and antioxidant activity of polysaccharides from jujuba by classical and ultrasound extraction. *Int. J. Biol. Macromol.*, 63, 150-153.
- [60] Luo, Q. L., Tang, Z. H., Zhang, X. F., Zhong, Y. H., Yao, S. Z., Wang, L. S., Luo, X. (2016). Chemical properties and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium officinale*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 89, 219-227.
- [44] Zhang, X., Chen, J., Mao, M., Guo, H., Dai, Y. (2014). Extraction optimization of the polysaccharide from *Adenophorae radix* by central composite design. *Int. J. Biol. Macromole.*, 67, 318-322.
- [45] Li, P., Zhou, L., Mou, Y., Mao, Z. (2015). Extraction optimization of polysaccharide from *Zanthoxylum bungeanum* using RSM and its antioxidant activity. *Int. J. Biol. macromole.*, 72, 19-27.
- [46] Hammi, K.M., 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 Chem.*, 212, 476-484.
- [47] فرهمند، ع؛ وریدی، م؛ کوچکی، آ. (1393) تعیین شرایط بهینه استخراج موسیلاژ دانه به، به کمک طرح مرکب مرکزی و ارزیابی برخی خصوصیات عملکردی آن. مجموعه مقالات نخستین همایش ملی الکترونیکی دستاوردهای نوین در علوم غذایی، زاهدان.
- [48] Garcia-Ochoa, F., Casas, J. A. (1992). Viscosity of locust bean gum solutions. *J. Sci. Food and Agri.*, 59, 97-100.
- [49] Koocheki, A., Mortazavi, S. A., Shahidi, F., Razavi, S., Kadkhodae, R., Milani, J. M. (2010). Optimization of mucilage extraction from Qodume shirazi seed (*Alyssum homolocarpum*) using response surface methodology. *J. Food Process Eng.*, 33, 861-882.
- [50] Bostan, A., Razavi, S. M., Farhoosh, R. (2010). Optimization of hydrocolloid extraction from wild sage seed (*Salvia macrosiphon*) using response surface. *Int. J. Food Prop.*, 13, 1380-1392.
- [51] Amid, B., Mirhosseini, H. (2012). Optimization of aqueous extraction of gum from durian (*Durio zibethinus*) seed: A potential, low cost source of hydrocolloid. *Food Chem.*, 132, 1258-1268.
- [52] Karazhiyan, H., Razavi, S. M. A., Phillips, G.

- [61] Guo, L., Zhu, W., Xu, F., Liu, M., Xie, Y., Zhang, J. (2014). Optimized ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Cyclina sinensis* and evaluation of antioxidant activities in vitro. *CyTA J. Food*, 12, 32-39.
- [62] Chen, Y., Xie, M. Y., Nie, S. P., Li, C., Wang, Y. X. (2008). Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chem.*, 107, 231-241.
- [63] Tan, L. H., Zhang, D., Yu, B., Zhao, S. P., Wang, J. W., Yao, L., Cao, W. G. (2015). Antioxidant activity and optimization of extraction of polysaccharide from the roots of *Dipsacus asperoides*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 81, 332-339.
- [64] Li, Q., Yu, N., Wang, Y., Sun, Y., Lu, K., Guan, W. (2013). Extraction optimization of *Bruguiera gymnorhiza* polysaccharides with radical scavenging activities. *Carbohydr. Polym.*, 96, 148-155.
- [65] Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Hu, R., Zhang, K. Li, Z. (2006). In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 2441-2445.
- [66] Li, Q., Yu, N., Wang, Y., Sun, Y., Lu, K., Guan, W. (2002). Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. *Bioorgan. Med. Chem.*, 10, 4067-4073.
- [67] Jeong, J.B., Seo, E.W., Jeong, H.J. (2009). Effect of extracts from pine needle against oxidative DNA damage and apoptosis induced by hydroxyl radical via antioxidant activity. *Food Chem. Toxic.*, 47, 2135-2141.
- [68] Li, Q., Yu, N., Wang, Y., Sun, Y., Lu, K., Guan, W. (2013). Extraction optimization of *Bruguiera gymnorhiza* polysaccharides with radical scavenging activities. *Carbohydr. Polym.*, 96, 148-155.