

استخراج پلی ساکارید محلول در آب از قارچ خوراکی صدفی به کمک امواج فراصوت و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی آن

حسین جوینده^{۱*}، زهرا حاجی ابراهیمی فروشانی^۲

۱- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی

۲- کارشناس ارشد صنایع غذایی

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۳)

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تأثیر امواج فراصوت در توان‌های ۸۰-۴۰ درصد (معادل ۲۳۲-۴۶۴ وات)، دماهای استخراج ۸۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های استخراج ۳۰-۱۰ دقیقه بر میزان راندمان استخراج پلی ساکارید محلول در آب از قارچ خوراکی صدفی (*Pleurotus ostreatus*) انجام پذیرفت. بهینه‌یابی فرایند استخراج و بررسی تأثیر اثرات اصلی و متقابل فاکتورها با استفاده از روش سطح پاسخ و به کمک طرح Box-Behnken با سه متغیر و در سه سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی انجام شد. همچنین پلی ساکارید استخراج شده از نظر ظرفیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال OH و DPPH) مورد بررسی قرار گرفت. بهینه‌سازی بازده استخراج پلی ساکارید به کمک روش سطح پاسخ نشان داد که ترکیبی از توان امواج فراصوت ۵۸/۰۶ درصد (معادل ۳۳۷ وات)، دمای استخراج ۶۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد و زمان امواج‌دهی ۲۱/۷۲ دقیقه باعث بیشترین بازده (۱۷/۷۱ درصد) استخراج گردید. نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که هرچند پلی ساکارید استخراجی در مقایسه با آنتی اکسیدان‌های طبیعی اسید آسکوربیک و سنتزی BHT از قابلیت کمتری در جذب رادیکال‌های آزاد برخوردار بود اما خواص ضد اکسایشی قابل قبولی از خود نشان داد.

کلید واژگان: بهینه‌یابی، قارچ صدفی، روش سطح پاسخ، فعالیت آنتی اکسیدانی

* نویسنده مسئول: hosjooy@asnruk.ac.ir

۱- مقدمه

باتوجه به گرایش روز افزون بشر به درمان توسط مواد طبیعی، قارچ‌ها می‌توانند منبعی مناسب برای تأمین این نیاز باشند. مؤثر و ارزان بودن و سهولت استفاده (تهیه و مصرف) قارچ‌ها از مهمترین مزایای آن‌ها به‌عنوان ترکیبات فراسودمند است. خاصیت درمانی قارچ‌های ماکروسکوپی تا سال‌های اخیر در پرده‌ای از ابهام باقی مانده بود تا اینکه بررسی‌های علمی، خواص دارویی و تغذیه‌ای آن‌ها را نشان داد. از جمله این خواص می‌توان به خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی، ضدحساسیت، تقویت سیستم ایمنی، ضدتوموری، کاهش قند و فشار خون اشاره کرد [۱].

پلی ساکاریدها از جمله ترکیبات مهم و مفید در قارچ‌ها هستند و دارای ویژگی‌های تغذیه‌ای مناسبی مانند ضدسرطان، جاذب رادیکال‌های آزاد، افزایش تولید هیدروکسی پرولین و گلیکوزآمینوگلیکان (مؤثر در درمان بیماری‌های مفاصل) می‌باشند [۲]. تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع پلی ساکارید از اسپور، میسلیم و محیط کشت مایع قارچ‌ها جدا شده است. از این پلی ساکاریدها می‌توان به بتا دی-گلوکان‌ها، هتروپلی-ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها اشاره کرد. پلی ساکاریدهای کیتین و کیتوزان که در دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شوند دارای خواص دارویی هستند؛ به‌طوری که در تنظیم عمل کبد، روده و کلیه سهم بسزایی دارند [۳]. تحقیقات نشان داده است که پروتئین‌های متصل به پلی ساکاریدهایی که از قارچ خوراکی استخراج شده است، دارای فعالیت ضدتومور و ضد دیابت هستند [۴]. همچنین پلی ساکاریدهای قارچ *Ganoderma lucidum* باعث کاهش قند خون در موش‌های آزمایشگاهی به‌وسیله آزاد ساختن انسولین از سلولهای β -پانکراس می‌شود [۵]. تحقیقات اولیه که توسط هیکیو و همکاران [۶] در سال ۱۹۸۵ انجام گرفت نشان داد که پلی ساکاریدهای موجود در این قارچ باعث کاهش قند خون می‌شوند.

یکی از تغییرات عمده‌ای که در حین فراوری، توزیع، انبارداری و آماده‌سازی مواد غذایی روی می‌دهد، اکسیداسیون روغن‌ها و چربی‌ها است. این رویداد نه‌تنها باعث از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای می‌شود، بلکه محصولات اکسیدشده‌ای مانند رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند که منجر به واکنش‌های متعدد نامطلوب شیمیایی می‌گردد. به‌علاوه، هرچند در متابولیسم بسیاری از ارگانسیم‌ها، اکسیداسیون یکی از مهمترین فرایندها برای تأمین انرژی است، اما برخی از اکسیداسیون‌های غیرکنترل شده منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود که برای سلامتی بدن مضر هستند. این گونه‌های فعال اکسیژن که غالباً شامل آنیون‌های سوپراکساید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشند [۷] به دلیل الکترون‌های تنها و نامتعادل خود بسیار ناپایدار هستند و ممکن است باعث ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در بدن شوند. این آسیب‌ها ممکن است به صورت بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت و سرطان بروز نماید [۸]. یکی از روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات، سنجش قدرت آن‌ها در مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل می‌باشد. رادیکال‌های هیدروکسیل به‌عنوان فعال‌ترین رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شوند که می‌توانند از تمام غشاهای سلولی به‌راحتی عبور نموده و با ترکیبات داخل سلولی مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA وارد واکنش شوند و منجر به آسیب بافتی و یا مرگ سلولی شوند [۹]. بنابراین مهار رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل برای دفاع آنتی‌اکسیدانی در سلول‌ها یا سیستم‌های غذایی بسیار مهم است. همچنین، بررسی فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. رادیکال DPPH یک رادیکال لیوفیل است که دارای جذب بیشینه در طول موج ۵۱۷ نانومتر است. در این روش رنگ ارغوانی رادیکال‌های DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر، توسط آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش یافته و به رنگ زرد

استخراج با آب داغ (۴/۷۶ درصد) تعیین شد [۱۴]. دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲/۳ ساعت، شرایط قلیایی ۷ درصد و نسبت آب به مواد ۲۳ میلی‌لیتر بر گرم به عنوان شرایط بهینه استخراج گزارش گردید. همچنین در این تحقیق اختلافی از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی (جذب رادیکال سوپراکساید و مهار رادیکال DPPH) میان پلی‌ساکارید استخراج شده در شرایط قلیایی با شرایط آب داغ مشخص نگردید.

قارچ خوراکی صدفی یا پلوروتوس (*Pleurotus ostreatus*)، در میان سایر قارچ‌های خوراکی دومین بازار تولید و مصرف را در دنیا به خود اختصاص داده است. این نوع قارچ‌ها علاوه بر ظاهر زیبا و عطر و طعم دلپذیر، منبع غذایی ارزشمندی برای انسان به حساب می‌آیند و انواع مختلفی از گونه‌های آن در جهان شناخته شده است [۱۵]. گونه‌های مختلف جنس پلوروتوس از جمله قارچ‌های تجزیه کننده‌ای است که مستقیماً روی بسترهای کشت قادر به رشد بوده و نیازی به عملیات تخمیر اولیه یا کمپوست‌سازی برای کشت آن نمی‌باشد [۱۶]. ویژگی‌های منحصر به فرد تولید این قارچ نظیر سادگی روش تولید، سرعت بالای رشد، مقاومت در برابر بیماری‌ها و آفات، امکان استفاده از ضایعات کشاورزی و صنعت غذا در تولید آن [۱۷] و همچنین خواص جالب توجه غذایی و دارویی آن همانند تأمین مواد مغذی مورد نیاز بدن شامل پروتئین، فیبر، املاح و ویتامین‌ها و تأثیر مفید بر سلامتی انسان بویژه جلوگیری از سرطان کولون و سینه [۱۸]، کاهش کلسترول خون، آنتی‌آتروژنیک (ضد بیماری‌های قلبی-عروقی) [۱۹]، خواص آنتی‌اکسیدانی [۲۰] و ضد میکروبی [۲۱] و بسیاری از مزایای دیگر سبب شده است که تولید آن به عنوان محصولی ارزشمند مورد توجه بسیاری از محققین قرار گیرد. امروزه پلی‌ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی به دلیل خواص تغذیه‌ای و درمانی، با قیمت بسیار بالایی در بازارهای جهانی به فروش می‌رسد. این درحالی است که اطلاعات و مستندات کافی در خصوص استخراج پلی‌ساکارید

تبدیل می‌شود. درجه بی‌رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان مربوطه می‌باشد [۱۰].

تاکنون تحقیقات محدودی در زمینه استخراج پلی‌ساکارید از انواع قارچ و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن انجام شده است. Kan و همکاران [۱۱] با بررسی تأثیر عوامل مؤثر در استخراج پلی‌ساکارید حاصل از قارچ جان‌افزا (*Ganoderma lucidum*)، بهترین شرایط استخراج جهت بالاترین راندمان پلی‌ساکارید (۲/۴۴ درصد) را زمان ۱۳۷ دقیقه، نسبت آب به مواد ۳۵ میلی‌لیتر بر گرم و دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد تعیین نمودند. این محققین خاصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده با کمک اتانول ۸۰ درصد را بسیار بالاتر از سایر غلظت‌ها (۴۰ و ۶۰ درصد اتانول) گزارش نمودند. Zhang و همکاران [۱۲] از امواج فراصوت جهت استخراج پلی‌ساکارید از قارچ شاه صدف (*Pleurotus eryngii*) استفاده نمودند. این محققین استفاده از توان ۵۱۷ وات، نسبت آب به مواد ۱۹ میلی‌لیتر بر گرم و زمان ۳۹ دقیقه را به‌عنوان بهترین شرایط جهت استخراج پلی‌ساکارید (راندمان ۳۴/۳ درصد) تعیین نمودند. در این تحقیق نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده با کمک اتانول ۸۰ درصد بسیار بالاتر از سایر غلظت‌ها (۳۰ و ۶۰ درصد اتانول) مشخص شد. Zou و همکاران [۱۳] بهترین شرایط استخراج پلی‌ساکارید از قارچ گوش زله‌ای (*Auricularia auricula*) را نسبت آب به مواد ۳۸/۷۷ میلی‌لیتر بر گرم، دمای ۹۳/۹۸ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳/۴۱ ساعت گزارش نمودند. در این شرایط میزان راندمان استخراج پلی‌ساکارید ۱۰/۴۶ درصد تعیین گردید و توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل توسط آن در غلظت‌های مشابه بالاتر از آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT بود. در تحقیقی دیگر، استخراج پلی‌ساکارید از میسیلیوم قارچ *Monascus* توسط آب داغ با شرایط قلیایی مقایسه گردید و میزان راندمان در حالت قلیایی (۱۰/۱ درصد) بسیار بالاتر از

مدت ۲ ساعت مخلوط و شستشو شد. پس از شستشو، ترکیبات قارچ به کمک سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از مخلوط الکلی جداسازی و در نهایت در آون تحت خلاء خشک شد. فرایند استخراج با کمک دستگاه حمام فراصوت (Elmasonic, مدل P60H, Germany) قابل تنظیم تا حداکثر توان ۵۸۰ وات (معادل ۱۰۰ درصد) و در فرکانس ۶۰ هرتز انجام پذیرفت. در این تحقیق فرآیند استخراج پلی ساکارید از ۲۰ گرم نمونه خشک شده قارچ با آب داغ (به نسبت ثابت ۱ به ۱۵) و در توان‌های مختلف امواج فراصوت (۴۰ تا ۸۰ درصد)، دماهای مختلف (۵۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های مختلف استخراج (۱۰ تا ۳۰ دقیقه) با توجه به آزمون‌های مقدماتی انجام پذیرفت. از اتانول ۸۰ درصد جهت تکمیل فرآیند استخراج و رسوب‌دهی پلی-ساکارید حاصل استفاده شد. پلی ساکارید رسوب کرده در آون تحت خلا به کمک هوای گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و توزین گردید و بازده استحصال پلی ساکارید به کمک رابطه زیر تعیین گردید:

$$\text{رندمان استخراج (\%)} = \frac{\text{وزن پلی ساکارید حاصل}}{\text{وزن قارچ خشک اولیه}} \times 100$$

معادله ۱

۲-۲-۲- بررسی خصوصیت آنتی‌اکسیدان پلی ساکارید استخراج شده

۲-۲-۲-۱- سنجش قدرت پلی ساکارید در مهار رادیکال

هیدروکسیل (OH)

توانایی و قابلیت جذب رادیکال‌های هیدروکسیل توسط پلی ساکارید استخراج شده به کمک روش ارائه شده توسط ژونگ و همکاران ارزیابی شد [۲۳]. نمونه پلی ساکاریدها در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در غلظت‌های متفاوت ۵۰ تا ppm ۳۰۰ حل شدند. محلول نمونه با ۱ میلی‌لیتر سولفات آهن (۱/۵ مول) و ۰/۳ میلی‌لیتر سدیم سالیسیلات (۲۰ مولار) مخلوط و سپس محلول حاصل با ۰/۷ میلی‌لیتر از H_2O_2 (۶ مولار)

از قارچ خوراکی صدفی، به‌ویژه نحوه تأثیر امواج فراصوت بر فرایند استخراج وجود ندارد. بنابراین، این پژوهش به منظور بررسی تأثیر شرایط مختلف تیمار فراصوت بر میزان استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی صدفی انجام پذیرفت. از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه‌ی فاکتورهای مورد بررسی استفاده شد زیرا در این روش جهت حصول حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمون، تیمارهای کمتر و همچنین زمان کمتری مورد نیاز است. به‌علاوه، در این پژوهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی یا ویژگی جذب رادیکال‌های آزاد توسط پلی ساکارید استخراج شده به روش‌های مختلف بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مصرفی

قارچ خوراکی صدفی (شرکت قارچ آرین، کرج) از بازار خریداری گردید. قارچ‌ها به منظور جداسازی تمامی ناخالصی‌ها و مواد خارجی به‌صورت دستی تمیز گردیدند و سپس با آب به خوبی شسته شدند. سپس با آب مقطر آبکشی شدند و در آون تحت خلا در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل یک شبانه روز قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. اتانول از شرکت رازی تهیه گردید و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی صدفی

استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی صدفی به کمک روش مزارعی و همکاران [۲۲] انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ۲۰۰ گرم قارچ خشک شده در یک مخلوط کن خرد شد و به پودر نرمی تبدیل شد. سپس جهت غیرفعال کردن آنزیم‌های قارچ و همچنین حذف مواد رنگی، چربی و الیگوساکاریدها، پودر قارچ ۳ بار با اتانول ۶۰ درصد با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به

۳-۲- طرح آزمایش‌ها و تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی شرایط مناسب استخراج پلی‌ساکارید (زمان استخراج، دمای استخراج و توان فراصوت)، با انجام آزمایش‌های مقدماتی، محدوده متغیرها با توجه به اهداف مورد نظر یعنی بیشینه نمودن میزان استخراج تعیین گردید. به منظور بهینه‌سازی فرایند استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی (*Pleurotus ostreatus*)، از طرح باکس بنکن (*BBD*) استفاده شد. در این تحقیق سه متغیر مستقل شامل میزان توان امواج فراصوت (X_1)، در محدوده ۸۰-۴۰ درصد، زمان استخراج (X_2)، در محدوده ۳۰-۱۰ دقیقه و دمای استخراج (X_3)، در محدوده ۸۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد هر کدام در سه سطح در نظر گرفته شد (جدول ۱). پس از انجام آزمون‌های پیشنهادی مطابق نرم افزار دیزاین اکسپرت^۱ نسخه ۱۱ (جدول ۲)، مدل‌سازی براساس نتایج آزمون‌های اصلی صورت پذیرفت و شکل‌های سه بعدی جهت بررسی روند تغییرات رسم شدند.

در روش سطح پاسخ برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و اثرات متقابل احتمالی بین فاکتورها را بر هر ویژگی مورد مطالعه جداگانه بررسی می‌کند. مدل مورد استفاده در این تحقیق رابطه درجه دوم می‌باشد که به صورت زیر نمایش داده می‌شود.

معادله ۴

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

در این معادله Y ویژگی مورد مطالعه، β ثابت مدل، β_1 ، β_2 و β_3 ضرایب خطی، X_1 و X_2 متغیرهای مستقل در شکل کد شده، β_{12} ، β_{13} و β_{23} اثر متقابل متغیرها و β_{11} ، β_{22} و β_{33} ضریب درجه دوم متغیرهای مستقل می‌باشد [۲۲]. جدول ۱ متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها را نشان می‌دهد.

مخلوط شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ماکزیمم جذب در ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط مشابهی حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و فاقد پلی‌ساکارید به‌عنوان نمونه شاهد تهیه شد. درصد مهار رادیکال هیدروکسیل به کمک رابطه زیر تعیین گردید:

$$OH\% = 1 - \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

معادله ۲

A_0 : میزان جذب مخلوط بدون پلی‌ساکارید در طول ۵۶۲ نانومتر

A_1 : میزان جذب مخلوط حاوی پلی‌ساکارید در طول ۵۶۲ نانومتر

۲-۲-۲-۲- سنجش قدرت پلی‌ساکارید در مهار رادیکال

DPPH

ارزیابی خاصیت جذب رادیکال آزاد پلی‌ساکارید استخراج شده با استفاده از روش بلیوس [۲۴] با کمی تغییرات انجام گرفت. پس از آماده‌سازی محلول DPPH (۰/۱ میلی‌مول در متانول)، ۱ میلی‌لیتر از این محلول به مقدار ۳ میلی‌لیتر از محلول متانولی حاوی غلظت‌های مختلف پلی‌ساکارید (۵۰ تا ۳۰۰ ppm) اضافه شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، میزان جذب مخلوط در ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتری (مدل Genesys، ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد. مخلوطی مشابه حاوی اسید آسکوربیک به عنوان نمونه شاهد تهیه گردید. میزان جذب کمتر مخلوط واکنش، نشان دهنده فعالیت بیشتر جذب رادیکال‌های آزاد می‌باشد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید:

$$DPPH\% = 1 - \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

معادله ۳

A_0 : میزان جذب مخلوط بدون پلی‌ساکارید در طول ۵۱۷ نانومتر

A_1 : میزان جذب مخلوط حاوی پلی‌ساکارید در طول ۵۱۷ نانومتر

Table 1 Coded and uncoded levels of independent variables according to the CCD

| Independent variables | Symbol | Coded levels | | |
|----------------------------------|----------------|--------------|----|----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Extraction ultrasounic power (%) | X ₁ | 40 | 60 | 80 |
| Extraction temperature (°C) | X ₃ | 50 | 65 | 80 |
| Extraction time (min) | X ₂ | 10 | 20 | 30 |

Table 2 Experimented and predicted yield values of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* obtained from BBD design

| Sample No. | Extraction power (%) | Extraction temperature (°C) | Extraction time (°C) | Experimented values | Predicted values |
|------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|------------------|
| 1 | 40 | 50 | 20 | 14.87 | 14.93 |
| 2 | 40 | 65 | 30 | 15.91 | 16.08 |
| 3 | 40 | 80 | 20 | 15.18 | 15.12 |
| 4 | 40 | 65 | 10 | 15.28 | 15.19 |
| 5 | 60 | 80 | 30 | 16.11 | 16.11 |
| 6 | 60 | 65 | 20 | 17.46 | 17.71 |
| 7 | 60 | 80 | 10 | 15.12 | 15.32 |
| 8 | 60 | 50 | 30 | 15.78 | 15.97 |
| 9 | 60 | 65 | 20 | 18.01 | 17.90 |
| 10 | 60 | 65 | 20 | 17.64 | 17.81 |
| 11 | 60 | 65 | 20 | 17.83 | 17.96 |
| 12 | 60 | 65 | 20 | 17.44 | 17.65 |
| 13 | 60 | 50 | 10 | 15.59 | 15.54 |
| 14 | 80 | 80 | 20 | 14.27 | 14.51 |
| 15 | 80 | 65 | 10 | 14.95 | 14.82 |
| 16 | 80 | 50 | 20 | 14.63 | 14.79 |
| 17 | 80 | 65 | 30 | 15.04 | 15.03 |

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین تاثیر متغیرهای مستقل بر بازده

استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی

صدفی

۳-۱-۱- تاثیر توان امواج فراصوت

توان امواج از فاکتورهای موثر بر استخراج پلی ساکاریدها به روش فراصوت می باشد. در تحقیقات متعدد از روش فراصوت به منظور تسریع فرایند استخراج بویژه در دمای پایین جهت جلوگیری از تغییرات ساختاری و مولکولی پلی ساکاریدهای استخراجی و حفظ خواص زیستی آنها استفاده شده است [۲۵-۲۸]. شکل ۱-ا اثر توانهای مختلف بر بازده استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی صدفی را در حالی که دو متغیر دیگر یعنی زمان و دمای استخراج در نقطه مرکزی ثابت

نگه داشته شدند را نشان می دهد. همان طور که در شکل ۱-ا می توان مشاهده نمود، با افزایش قدرت امواج تا حدود ۶۵ درصد توان دستگاه، میزان بازده پلی ساکارید استحصالی افزایش یافت اما در توانهای بالاتر کاهش یافت. دلیل افزایش راندمان هنگام به کارگیری سطوح مناسب امواج آن است که با عبور امواج صوت از میان محیط مایع، حبابهای زیادی ایجاد می شود. از طرفی دما و فشار در داخل حبابها بسیار بالا بوده و حبابها در مدت زمان خیلی کوتاه فرو می پاشند. شوک شدید امواج و سرعت بالای آنها، نفوذ حلال به داخل بافت های گیاهی را تسریع کرده و به این ترتیب مواد بین سلولی از طریق تجزیه دیواره سلولی رها شده و وارد حلال می شوند [۲۵]. در هر حال، استفاده از توان بالا نیز می تواند سبب تجزیه ترکیبات سلولی نظیر پلی ساکاریدها و در نتیجه کاهش راندمان استخراج گردد [۲۷].

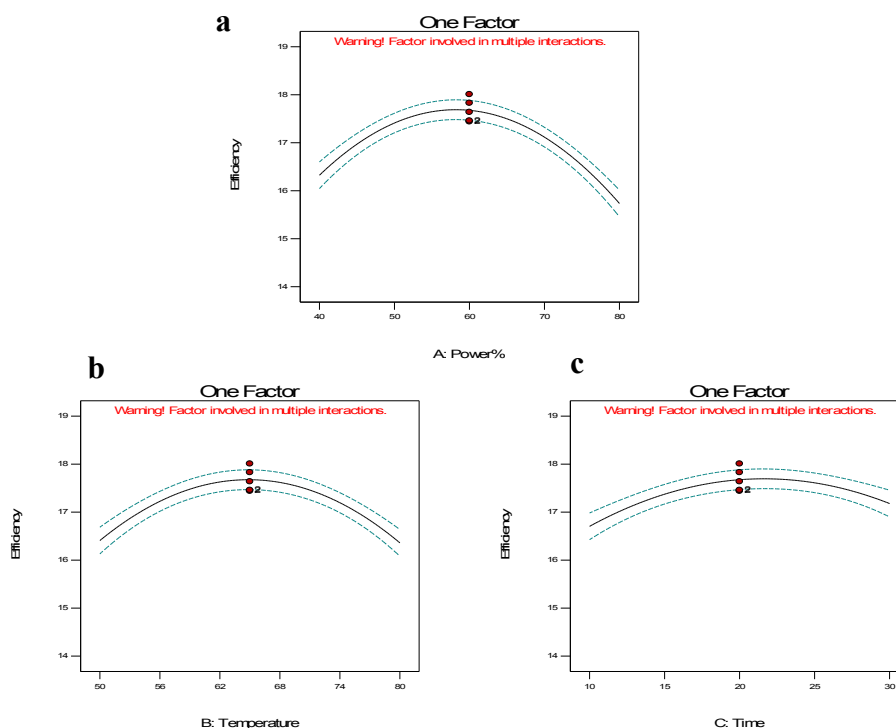


Fig 1 Effect of different percentage of ultrasonic power (a), temperature (b) and time (c) on the yield of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*

توان‌های بالاتر از آن تأثیری در این زمینه ندارد [۳۱]. امواج فراصوت می‌تواند از طریق ایجاد حباب‌های میکروسکوپی تأثیرگذار باشد. نوع و تعداد حباب‌های ایجاد شده و فروپاشی شده، بستگی مستقیم به شدت امواج فراصوت دارد. حباب‌های فروپاشی شده، گرادیان‌های برشی بالا و شوک‌های مکانیکی بوجود می‌آورند که باعث فروپاشیدن دیواره های سلولی می‌شود. به این ترتیب امواج فراصوت با تأثیر بر میزان نفوذ حلال به سلول ها، خروج اجزاء از سلول به حلال را شتاب بخشیده و در نتیجه سرعت انتقال جرم را افزایش می‌دهد [۲۶].

۳-۱-۲- تأثیر دمای استخراج

شکل ۱-۱-۲ b تأثیر دماهای مختلف امواج دهی را بر راندمان استخراج پلی‌ساکارید از قارچ خوراکی صدفی نشان می‌دهد. در این حالت زمان امواج دهی و توان امواج فراصوت به ترتیب در نقطه مرکزی (۲۰ دقیقه و ۶۵ درصد توان دستگاه) ثابت نگه داشته شدند. همان‌طور که در شکل ۱-۱-۲ b نشان داده شده است، بازده استخراج پلی‌ساکارید به طور خطی با افزایش دما تا حدود ۶۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. دلیل افزایش راندمان با افزایش دما آن است که دمای بالا سبب کاهش ویسکوزیته، تسریع حرکت مولکولی و افزایش ضریب هدایت حلال به داخل ماده جامد می‌شود؛ در نتیجه سبب افزایش حلالیت و انتشار مواد گیاهی مورد هدف به داخل محلول و

نتایج پژوهش حاضر با نتایج تهموزی [۲۸] و جوینده و همکاران [۲۹] مطابقت داشت. تهموزی اثر توان امواج فراصوت در محدوده ۱۰۰ تا ۲۷۵ وات را بر میزان استخراج پلی‌ساکارید از برگ درخت بلوط مورد بررسی قرار داد و مشاهده نمود که با افزایش توان امواج فراصوت، راندمان استخراج بیشتر می‌شود. وی دلیل افزایش راندمان را افزایش ضریب انتشار پلی‌ساکاریدها و افزایش حلالیت آنها در توان‌های بالا عنوان نموده است. جوینده و همکاران [۲۹] نیز در بررسی تعیین شرایط بهینه استخراج پلی‌ساکارید از میوه گیاه قره‌قاپ با استفاده از امواج فراصوت در محدوده ۱۴۰-۶۰ وات نشان دادند که با افزایش توان ابتدا میزان استخراج افزایش می‌یابد اما در صورت بهره‌گیری از توان‌های بالاتر میزان استخراج پلی‌ساکارید کاهش می‌یابد. یانگ گوآنگ و همکاران (۲۰۱۲) اثر توان ۱۸۰ تا ۴۳۰ وات را بر نوعی گیاه دارویی به نام آترکتیس بررسی نمودند و نشان دادند که با افزایش توان، راندمان استخراج به دلیل پدیده حفره‌زایی یا کاویتاسیون^۱ افزایش می‌یابد [۳۰]. Zou و همکاران تأثیر توان امواج فراصوت بر میزان بازده استخراج پلی‌ساکارید از گیاه دارویی کلونوپسیس پیلوسولا^۲ را بررسی نمودند و گزارش نمودند که با افزایش توان تا ۳۲۰ وات راندمان افزایش یافته اما استفاده از

1. Cavitation
2. *Codonopsis pilosula*

intestinalis با استفاده از امواج فراصوت گزارش نمودند که میزان راندمان استخراج با افزایش دما از ۳۰ به ۹۰ درجه سانتی گراد به طور قابل توجهی افزایش می یابد و از ۲/۶۸ به ۸/۵۷ درصد می رسد. در هر حال برخلاف نتایج فوق، وانگ و همکاران وی راندمان بسیار بالاتر استخراج پلی ساکاید را در دمای محیط و شرایط قلیایی نسبت به استخراج با آب داغ ۹۰ درجه سانتی گراد گزارش نمودند [۱۴].

۳-۱-۳- تأثیر زمان استخراج

شکل ۱-۳ تأثیر زمان امواج دهی در سطوح مختلف را بر بازده استخراج پلی ساکاید از قارچ خوراکی صدفی نشان می دهد؛ ضمن آن که دو متغیر دیگر یعنی دمای استخراج و توان امواج فراصوت به ترتیب در نقطه مرکزی ۶۵ درجه سانتی گراد و ۶۰ درصد ثابت نگاه داشته شدند. همان طور که در شکل ۱-۳ مشاهده می شود، با افزایش زمان از ۱۰ به ۳۰ دقیقه، راندمان استخراج افزایش یافت. این وضعیت به دلیل افزایش در معرض قرار گرفتن پلی ساکایدها در محیط آبی و نفوذ آب به ماده خام خشک می باشد که سبب افزایش میزان پلی ساکایدها حل شده و خروج آن از ماده خام به طریق انتشار می گردد. علاوه بر این افزایش دمای استخراج، حلالیت پلی ساکایدها را افزایش خواهد داد و درجه بالاتری از استخراج را ارائه می کند [۳۲].

افزایش راندمان استخراج می شود. اگرچه ثابت شده است افزایش دما، محدودیت هایی هم دارد و علاوه بر اینکه هزینه استخراج افزایش می یابد اثر معکوس در راندمان دارد و می تواند سبب کاهش بازده شود زیرا ترکیبات مورد هدف تجزیه شده و در نتیجه ناخالصی و مواد نامحلول نیز وارد عصاره می شود [۳۲].

در پژوهشی که توسط Wang و همکاران روی پلی ساکایدهای یک نوع گیاه دارویی ترامیتیس صورت گرفت افزایش دما از ۴۰ به ۶۰ درجه سانتی گراد سبب افزایش راندمان استخراج شد. افزایش دما سبب افزایش انتشار پلی ساکایدها و افزایش حلالیت آنها می شود که با نتایج بدست آمده در این تحقیق و سایر پژوهش های انجام شده مطابقت داشت [۳۳]. Chen و همکاران اثر دماهای مختلف را بر راندمان استخراج پلی ساکاید از قارچ خوراکی مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند با افزایش دما تا ۶۰ درجه سانتی گراد راندمان افزایش می یابد [۳۵]. این محققین علت افزایش راندمان استخراج هنگام افزایش دما را کاهش ویسکوزیته عنوان نمودند چراکه در این شرایط حلال بهتر به داخل ماتریکس جامد نفوذ می کند و در نتیجه انتقال جرم سریعتر و آسان تر صورت می گیرد. همچنین رحیمی و همکاران [۳۶] در تحقیقی در مورد بررسی شرایط استخراج پلی ساکاید از جلبک *E.*

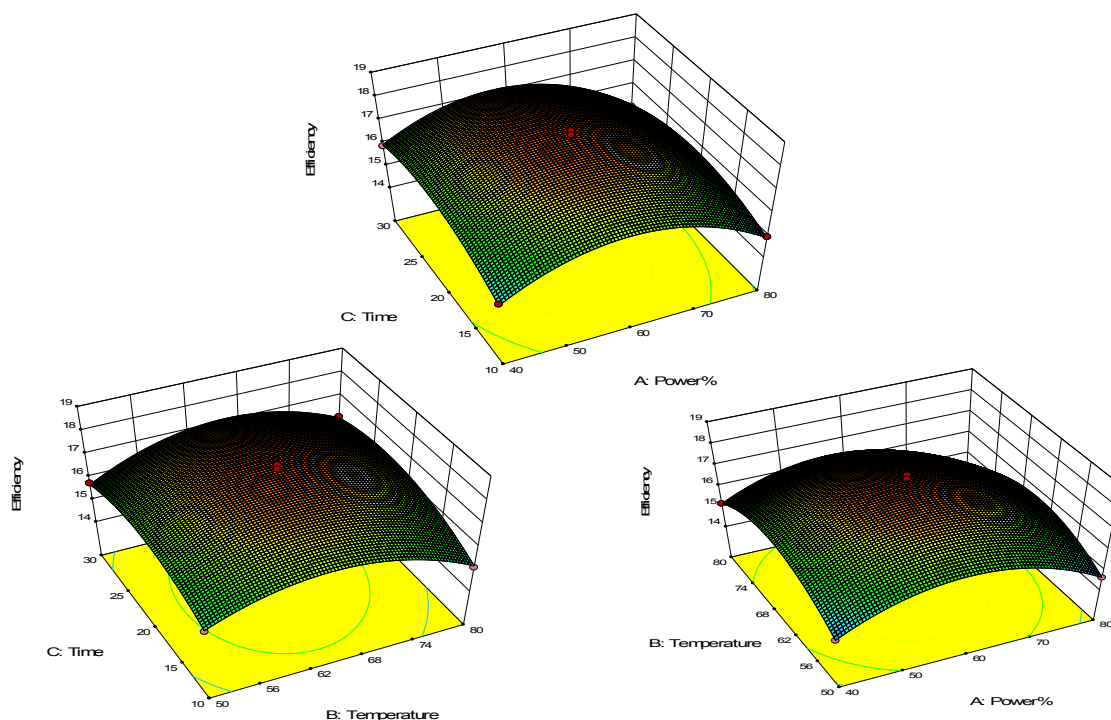


Fig 2 Response surface plots showing the significant interaction effects of different variables on the yield of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*

متغیرها را در قالب نمودار سه بعدی مشاهده کرد. شکل ۲ نمودارهای سه بعدی سطح مربوط به اثرات متقابل متغیرهای مورد آزمون را بر میزان راندمان پلی ساکارید استخراج شده نشان می دهد. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۳، تمامی اثرات متقابل معنی دار گردید و تمامی متغیرهای مورد بررسی توان-زمان، دما-زمان و توان-دما بر کارایی استخراج پلی-ساکارید اثری افزایشی داشتند (شکل ۲). شکل ۲-a نمودار سه بعدی سطح پاسخ اثر متقابل توان و زمان را هنگامی که دما در نقطه مرکزی (۶۵ °C) ثابت نگهداشته شده است نشان می دهد. همان گونه که قبلاً اشاره گردید، علت افزایش میزان استخراج پلی ساکارید در نتیجهی افزایش همزمان توان امواج و زمان استخراج به ترتیب به دلیل افزایش کاویتاسیون حباب های تشکیل شده و انتقال جرم می باشد. شکل ۲-b نمودار سه بعدی سطح پاسخ اثر متقابل زمان و دما را هنگامی که توان در نقطه مرکزی (۶۰ درصد) ثابت نگهداشته شده است نشان می دهد. همانطوری که می توان مشاهده نمود، دو متغیر مذکور به طور همزمان و تا حدی معین سبب افزایش میزان استخراج گردیده اند. نمودار ۲-c نیز به طور مشابه، اثر افزایشی دو متغیر توان و دما را هنگامی که زمان در نقطه مرکزی (۲۰ min) ثابت نگهداشته شده است نشان می دهد.

نتایج تحقیق حاضر با نتایج Wang و همکاران [۳۳] همخوانی داشت. این افراد افزایش راندمان استخراج پلی ساکارید از گیاه ترامیتیس روینیوفیلا را همگام با افزایش زمان استخراج با کمک امواج فراصوت گزارش نمودند. در هر حال، بر اساس نتایج این محققین، استفاده از زمان های بالاتر سبب تجزیه پلی ساکاریدها به دلیل ناپایداری در برابر حرارت می گردید. Wang و Zhong نیز نشان دادند که با افزایش زمان امواج دهی، راندمان استخراج پلی ساکاریدها از پالپ میوه لانگان افزایش می یابد [۳۴]. این محققین دلیل افزایش راندمان را به شکل گیری تعداد بیشتر حباب های کاویتاسیون و افزایش انتقال جرم نسبت دادند. در هر حال، برخلاف نتایج تحقیق حاضر، یانگ-گوانگ و همکاران گزارش نمودند که افزایش زمان امواج دهی تاثیر چندانی بر بازده استخراج ندارد چرا که هر چند با افزایش زمان امواج دهی میزان استخراج افزایش می یابد اما به دلیل هیدرولیز پلی ساکاریدها راندمان استخراج در نهایت تغییری نمی کند [۳۰].

۳-۱-۴- بررسی اثر متقابل متغیرهای مورد بررسی بر

بازده استخراج پلی ساکارید

در به کارگیری طراحی آزمایش، علاوه بر امکان پیش بینی مقدار بهینهی متغیرها و نیز بررسی جداگانهی اثر هر کدام از آنها در راندمان استخراج، می توان برهمکنش های موجود بین

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic polynomial model

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value |
|---------------------------|----------------|----|-------------|---------|----------------------|
| Model | 24.34 | 9 | 2.70 | 70.99 | < 0.0001*** |
| A: Ultrasonic power | 0.69 | 1 | 0.69 | 18.12 | 0.0038** |
| B: Extraction temperature | 0.0045 | 1 | 0.0045 | 0.12 | 0.7408 ^{ns} |
| C: Sonication time | 0.45 | 1 | 0.45 | 11.84 | 0.0108* |
| AB | 0.11 | 1 | 0.11 | 2.95 | 0.1298 ^{ns} |
| AC | 0.073 | 1 | 0.073 | 1.91 | 0.2091 ^{ns} |
| BC | 0.16 | 1 | 0.16 | 4.20 | 0.0796 ^{ns} |
| A ² | 11.42 | 1 | 11.42 | 299.69 | < 0.0001*** |
| B ² | 7.03 | 1 | 7.03 | 184.41 | < 0.0001*** |
| C ² | 2.27 | 1 | 2.27 | 59.58 | 0.0001*** |
| Residual | 0.27 | 7 | 0.038 | | |
| Lack of Fit | 0.028 | 3 | 0.009 | 0.16 | 0.9212 ^{ns} |

Behnken در جدول ۲ نشان داده شده است. چنان که مشاهده می شود، مقادیر تجربی اندازه گیری شده با مقادیر پیش بینی شده تطابق بالایی را نشان می دهند. با توجه به نتایج به دست آمده

۳-۲- آنالیز آماری و بررسی کارآمدی مدل

نتایج بازده استخراج پلی ساکارید اندازه گیری و پیش بینی شده مربوط به ۱۷ آزمایش انجام شده براساس مدل طرح Box-

شرایط بهینه شامل توان امواج فراصوت ۳۳۷ وات (معادل ۵۸/۰۶ درصد)، زمان امواج دهی ۲۱/۷۲ دقیقه و دمای استخراج ۶۵/۱۵ درجه سانتی گراد باعث بیشترین بازده (۱۷/۷۱ درصد) استخراج گردید (شکل ۳). برخلاف نتایج به دست آمده در این تحقیق، Kan و همکاران [۱۱] میزان راندمان پلی ساکارید استخراج شده از قارچ جان افزا (*Ganoderma lucidum*) در شرایط بهینه را بسیار پایینتر و مقدار ۲/۴۴ درصد و Zhang و همکاران [۱۲] مقدار راندمان پلی ساکارید استخراجی از قارچ شاه صدف (*Pleurotus eryngii*) بسیار بالاتر و مقدار ۳۴/۳ درصد گزارش نمودند. در هر حال در اکثر تحقیقات انجام شده در زمینه استخراج پلی ساکارید از گیاهان و انواع مختلف جلبک و قارچ، میزان راندمان پلی ساکارید استخراجی در محدوده نتایج به دست آمده در این تحقیق گزارش شده است که از جمله می توان به میزان راندمان قارچ گوش ژله ای (*Auricularia auricula*) با ۱۰/۴۶ درصد [۱۳]، جلبک *E. intestinalis* با ۸/۵۷ درصد [۳۶]، میوه قره قاط با ۱۳/۶۱ درصد و سرشاخه گل دار گیاه گل راعی با راندمان ۶/۶۹ درصد [۳۷] اشاره نمود.

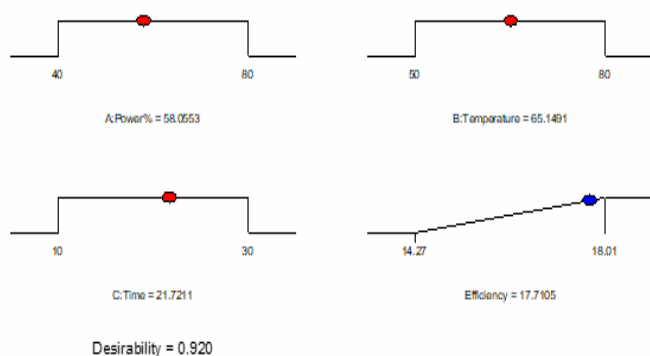


Fig 3 Schematic representation of the optimum values of factors, response and the corresponding levels

همچنین برای بررسی درستی و صحت نتایج حاصل از مدل، در شرایط آزمایشگاه در نقاط بهینه ای که نرم افزار داده بود یک آزمایش در ۳ تکرار انجام شد که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است. طبق این جدول، راندمان تجربی ۱۷/۵۸ درصد و راندمان پیش بینی شده ۱۷/۷۱ درصد شد. همانطور که مشاهده می شود اختلاف چندانی میان نتیجه پیش بینی شده توسط مدل و نتیجه به دست آمده از کار آزمایشگاهی مشاهده نمی شود.

در جدول ۲، بیشترین بازده استخراج در صورت به کارگیری ۶۰ درصد توان امواج فراصوت در دمای ۶۵°C و مدت زمان ۲۰ دقیقه به دست خواهد آمد. مطابق نتایج آنالیز داده ها (جدول ۳)، میزان بازده استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی صدفی با تابع درجه دوم سه متغیر مورد بررسی در ارتباط بود و همگی تأثیر معنی داری بر بازده استخراج داشتند ($p < 0.01$). به عبارت دیگر، با توجه به ضرایب به دست آمده، رابطه غیرخطی بین متغیرهای مستقل و بازده استخراج پلی ساکارید برقرار می باشد. همچنین، بر اساس نتایج آنالیز واریانس داده ها، مقادیر عددی R^2 و R^2 -adj به ترتیب ۰/۹۸۹، ۰/۹۷۵ و ۰/۹۶۷ تعیین شد. مقادیر عددی R^2 و R^2 -adj حاکی از این موضوع است که مدل رگرسیون تا چه حد می تواند تعیین کننده انحراف داده ها باشد و هر چه این مقادیر به واحد نزدیک باشد، پاسخ به دست آمده از مدل تجربی، به اعداد واقعی نزدیک تر است. همچنین مقادیر CV و PRESS به ترتیب ۱/۲۲ و ۰/۸۲ به دست آمد. بنابراین، با توجه به نتایج پارامترهای آماری حاصل از برازش مدل درجه دوم بر داده های تجربی می توان چنین نتیجه گیری کرد که معادله پیشنهادی به خوبی می تواند ارتباط بین متغیرهای استخراج (دمای استخراج، زمان استخراج و توان امواج فراصوت) و بازده پلی ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی را نشان دهد. با استفاده از روش آماری سطح پاسخ، معادله ۵ به عنوان مدل رگرسیونی برای پیش بینی میزان بازده استخراج پلی ساکارید به دست آمد که ارتباط تجربی بین میزان بازده پلی ساکارید استخراجی و متغیرهای آزمایش را نشان می دهد.

معادله ۵

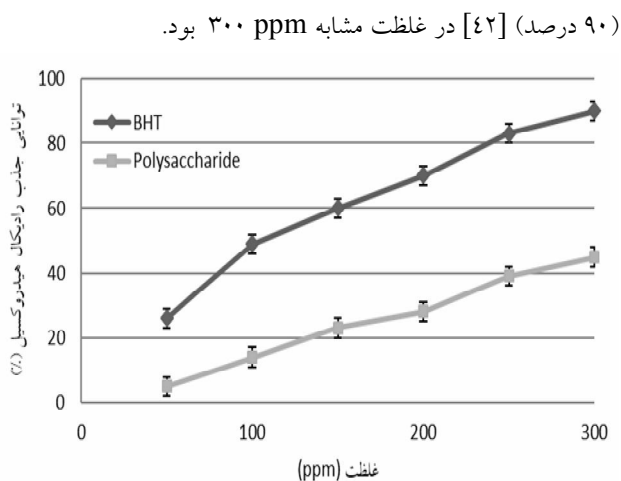
$$Y = -25.0829 + 0.5291X_1 + 0.7516X_2 + 0.2713X_3 - 0.0006X_1X_2 - 0.0007X_1X_3 + 0.0013X_2X_3 - 0.0041X_1^2 - 0.0057X_2^2 - 0.0073X_3^2$$

۳-۳- بهینه یابی فرآیند استخراج پلی ساکارید

شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج پلی ساکارید از قارچ خوراکی صدفی با استفاده از تکنیک بهینه سازی عددی با نرم افزار Design-Expert نسخه ۱۱ بررسی گردید. بدین منظور در ابتدا شرایط بهینه توسط نرم افزار انتخاب گردید.

Table 4 Performance of models in predicting the yield of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*

| Optimized conditions | | | Extraction yield | | |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------|-----------|--------------|
| Ultrasonic power (%) | Extraction temperature (°C) | Sonication time (min) | Experimented | predicted | Desirability |
| 58.06 | 65.15 | 21.72 | 17.58 ± 0.19 | 17.71 | 0.92 |

**Fig 4** Capability of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* on scavenging of OH radicals at different concentrations**۳-۴-۲- تعیین توانایی جذب رادیکال DPPH**

DPPH، رادیکال آزاد پایداری است که به طور گسترده به عنوان ابزاری برای تعیین مهار رادیکال آزاد، توسط پلی ساکاریدها پذیرفته شده است [۴۳]. خواص آنتی اکسیدانی پلی ساکارید استخراجی از قارچ خوراکی صدفی در توانایی مهار یا جذب رادیکال های DPPH در شکل ۵ نشان داده شده است. چنان که در شکل ۵ مشاهده می شود، فعالیت جذب رادیکال DPPH با افزایش غلظت پلی ساکارید افزایش یافت. نتایج نشان داد که پلی ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی ظرفیت آنتی اکسیدان قابل قبولی داشته و توانسته است بر رادیکال های آزاد DPPH بویژه در غلظت های بالا تأثیر بگذارد. در هر حال، جذب رادیکال آزاد DPPH توسط اسید آسکوربیک به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی بیشتر از پلی ساکارید بدست آمده در این تحقیق بود که نشان دهنده توانایی کمتر پلی ساکارید مورد مطالعه در شدت الکترون دهنده آن می باشد [۳۹].

۳-۴-۱- ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی پلی-**ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی****صدفی****۳-۴-۱- تعیین توانایی جذب رادیکال های هیدروکسیل****(OH)**

در بین انواع اکسیژن های واکنش دهنده، رادیکال هیدروکسیل فعال ترین رادیکال آزاد است که به همه مولکول های زیستی با شروع واکنش های زنجیره ای رادیکال آزاد حمله می کند [۳۸]. رادیکال های هیدروکسیل می توانند تقریباً با همه مولکول های بزرگ زیستی حمل کننده در سلول های زنده واکنش دهند و آسیب جدی به مولکول های زیستی مجاور وارد کنند [۳۹]. با توجه به تعریف بالا، حذف رادیکال هیدروکسیل (OH) برای دفاع از سیستم های غذایی یا سلولی در برابر اکسیداسیون بسیار مهم است. با توجه به شکل ۴، ظرفیت آنتی اکسیدانی پلی- ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی با توجه به توانایی جذب رادیکال های هیدروکسیل در غلظت های ۳۰۰-۵۰۰ ppm بررسی گردید. همانطور که از شکل ۴ پیداست، توانایی جذب رادیکال های هیدروکسیل توسط پلی ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی وابسته به غلظت می باشد. همچنین، میزان مهار شدن رادیکال های هیدروکسیل توسط آنتی اکسیدان مصنوعی BHT در غلظت ۳۰۰ ppm (۹۰ درصد) می باشد که این میزان برای پلی ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی در غلظت مشابه، ۴۶ درصد است. توانایی جذب رادیکال های هیدروکسیل توسط پلی ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی در این تحقیق کمتر از مقادیر گزارش شده برای پلی ساکارید استخراج شده از میوه *Ziziphus lotus* (۹۱ درصد) [۴۰]، پلی ساکارید استخراج شده از برگ *Hibiscus rosa-sinensis* (۶۰ درصد) [۴۱] و پلی ساکارید استخراج شده از برگ *Cordia myxa*

۴- نتیجه گیری کلی

قارچ‌ها از دیرباز به لحاظ خواص دارویی در کشورهای شرق آسیا مورد توجه بوده‌اند به طوری که مردم این کشورها به طور سنتی از قارچ‌های خوراکی به عنوان اکسیر زندگی و تقویت کننده روح و جسم استفاده می‌کردند. امروزه به دلیل خواص غذایی و دارویی قابل توجه پلی ساکارید استخراج شده از قارچ صدفی *Pleurotus ostreatus* تولید آن در بسیاری از نقاط دنیا مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین این تحقیق به منظور بررسی میزان راندمان پلی ساکارید محلول در آب استخراجی از قارچ صدفی در شرایط مختلف استخراج و با کمک امواج فراصوت انجام پذیرفت. نتایج نشان داد مدل به دست آمده در این پژوهش از R^2 و $Adj-R^2$ بالا و معنی دار و C.V. (ضریب تغییرات) پایین و PRESS مناسبی برخوردار بوده و آزمون عدم برازش معنی دار نگردید که نشان دهنده کارایی مدل ارائه شده در پیش بینی پارامترهای مورد ارزیابی است. همچنین اختلاف چندانی میان مقادیر بازده استخراج تجربی و پیش‌بینی شده وجود نداشت و مدل توانست با مطلوبیت بسیار بالایی (۰/۹۲ درصد) نتایج تجربی را به خوبی پیش‌بینی کند. هر چند ویژگی آنتی‌اکسیدانی پلی ساکارید مورد مطالعه در این تحقیق در مقایسه با بسیاری از پلی ساکاریدهای استخراجی از گیاهان دارویی پایین تر می‌باشد، اما با توجه به قیمت بالای این پلی ساکارید (حدود ۱ دلار به ازاء هر گرم)، استخراج و تولید این پلی ساکارید به عنوان مکمل غذایی و سلامت‌بخش توصیه می‌گردد.

۵- منابع

- [1] Lindequist, U, Niedermeyer, T.M.J., Jülich, W.D. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based compl. Alt. Medicine*. 2, 285- 299.
- [2] Pan, Y., Dong, S., Hao, Y., Zhou, Y., Ren, X., Wang, J., Wang, W., Chu, T. (2010). Ultrasonic-assisted extraction process of crude polysaccharides from Yunzhi mushroom and its effect on hydroxyproline and glycosaminoglycan levels. *Carbohydr. Polym.*, 81(1), 93-96.
- [3] Badalyan, S.M., Gharibyan, N.G., Kocharyan, A.E. (2007). Perspective in usage of bioactive substances of medicinal

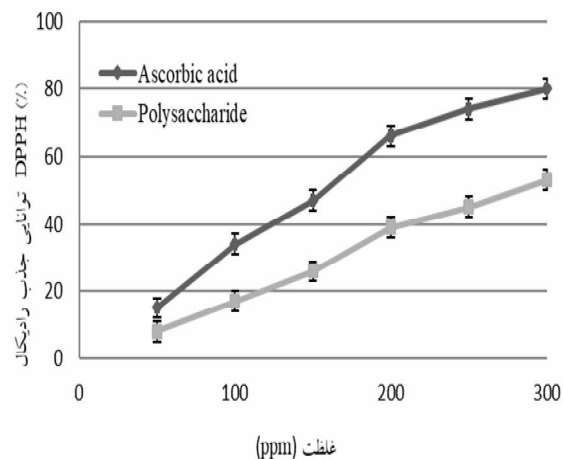


Fig 5 Antioxidant activity of extracted soluble polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* in terms of scavenging activity of DPPH radicals at different concentrations

میزان جذب رادیکال DPPH در غلظت ۳۰۰ ppm توسط اسید آسکوربیک ۸۰ درصد بود در حالی که این میزان برای پلی ساکارید مورد مطالعه در این تحقیق در غلظت مشابه تنها ۵۶ درصد بود. میزان جذب رادیکال DPPH توسط پلی ساکارید استخراج شده از قارچ خوراکی صدفی کمتر از مقادیر گزارش شده برای پلی ساکارید استخراج شده از میوه *Assyrian pulm* (۸۵ درصد) [۴۴]، پلی ساکارید محلول در آب استخراج شده از *Spirulina platensis* (۷۸ درصد) [۱۰]، پلی ساکارید استخراج شده از برگ *Althaea rosea* (۸۴ درصد) [۴۵] و عصاره خام استخراج شده از برگ گیاه پنیرک یا *Malva neglecta* (۸۵ درصد) [۴۶] در غلظت برابر ۳۰۰ ppm بود. هر چند خواص آنتی‌اکسیدانی قابل قبول پلی ساکارید استخراج شده می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات اسید دی-گالاکتورونیک و نیز ترکیبات فنلی متصل به پلی ساکاریدها باشد [۴۷]، اما دلیل پایین بودن خواص آنتی‌اکسیدانی پلی ساکارید استخراج شده احتمالاً می‌تواند به دلیل روش استخراج مورد استفاده باشد چرا که در حین شستشو با اتانول، ترکیبات مهم آنتی‌اکسیدانی نظیر مواد فنولی آزاد کاهش قابل توجهی می‌یابد [۴۸]. در حال *Vamanu* [۴۹] در نتایج کاملاً مشابه و در بررسی خواص مهارشدگی رادیکال‌های هیدروکسیل توسط نمونه‌های پلی ساکارید استخراج شده از میسلوم دو وارسته قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) مقدار پایتتر توانایی جذب رادیکال هیدروکسیل را در تمامی نمونه‌های پلی ساکارید استخراجی نسبت به اسید آسکوربیک گزارش نمودند.

- H.A., Teixeira, G.L., Avila, S., Hornung, P.S., Junior, A.M., Ribani, R.H. (2016). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi J. Biol. Sci.*, In press, Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>.
- [16] Savoie, J.M., Salmones, D., Mata, G., (2007). Hydrogen peroxide concentration measured in cultivation substrates during growth and fruiting of the mushrooms. *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* spp. *J. Sci. Food Agric.* 87, 1337–1344.
- [17] Sanchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 1321-1337.
- [18] Jedinak, A., Sliva, D. (2009). *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. *Int. J. Oncol.*, 33(6), 1307-1313.
- [19] Bobek P., Galbavy, S. (1999). Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. *Nahrung.*, 43, 339–342.
- [20] Bobek P, Ozdin L, Kuniak L. (1995). Antioxidative effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in hypercholesterolemic rat. *Pharmazie*, 50(6), 441–442.
- [21] Kunjadia P.D., Nagee A., Pandya P.Y., Mukhopadhyaya, P.N., Sanghvi, G.V. Dave, G.S. (2014). Medicinal and antimicrobial role of the oyster culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (higher Basidiomycetes) cultivated on banana agrowastes in India. *Int. J. Med. Mushr.*, 16(3), 227-38.
- [22] Mazarei, F., Jooyandeh, H., Hojjati, M., Noshad, M. (2017). Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa* L.) Leaf: Extraction, optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 95, 224–231.
- [23] Zhong, K., Lin, W., Wang, Q., Zhou, S. (2012). Extraction and radicals scavenging activity of polysaccharides with microwave extraction from mung bean hulls. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 51, 612–617.
- [24] Blios, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.*, 26, 1199-1200.
- [25] Solisova, M., Toma, S., Mason, T.J. (1997). Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from mushrooms in pharmaceutical and cosmetic industry. *Int. J. Med. Mushr.*, 9(3), 275-280.
- [4] Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J., Zhou, Sh. (2004). A phase I/II study of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. curt.: Fr.) Lloyd (*Aphyllophoro mycetideae*) extract in patients with type II diabetes mellitus. *Int. J. Med. Mushr.*, 6(1), 33-9.
- [5] Zhang, H.N., Lin, Z.B. (2004). Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 25, 191-195.
- [6] Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y., Hayashi, T. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta. Med.*, 51(4), 339 - 40.
- Apel K, Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 55, 373–99.
- [8] Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods*, 18, 757-781.
- [9] Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chem. Toxicol.*, 33(7), 601-617.
- [10] Kurd, F., Samavati, V. (2015). Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 74, 498–504.
- [11] Kan, Y., Chen, T., Wu, Y., Wu, J., Wu, J. (2015). Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 72, 151–157.
- [12] Zhang, A., Li, X., Chen, X., Yang, J., Sun, P. (2014). Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 65, 28-32.
- [13] Zou, Y., Jiang, A., Tian, M. (2015). Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricula* fruiting bodies. *Food Sci. Technol.*, 35(3), 428-433.
- [14] Wang, P., Chen, D., Jiang, D., Dong, X., Chen, P., Lin, Y. (2014). Alkali extraction and in vitro antioxidant activity of *Monascus mycelium* polysaccharides. *J. Food Sci. Technol.*, 51(7), 1251-1259.
- [15] Bellettini, M.B., Fiorda, F.A., Maieves,

- [36] Rahimi, F., Tabarsa, M., Rezaei, M. (2016). Ulvan from green algae *Ulva testinalis*: Optimization of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity. *J. Appl. Phycol.*, 28, 2979–2990.
- [37] Heydarian, M., Jooyandeh, H., Nasehi, B., Noshad, M. (2017). Characterization of *Hypericum perforatum* polysaccharides with antioxidant and antimicrobial activities: Optimization based statistical modeling. *International Journal of Biological Macromolecules* 104 (2017) 287–293.
- [38] Barry, H., Susanna, C. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 715–725.
- [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 assisted treatment. *Carbohydr. Polym.*, 81, 323–329.
- [40] Adeli, M., Samavati, V. (2015). Studies on the steady shear flow behavior and chemical properties of water-soluble polysaccharide from *Ziziphus lotus* fruit. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 72, 580–587.
- [41] Afshari, K., Samavati, V., Shahidi S.A. (2015). Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 74, 558–567.
- [42] Samavati, V., Lorestani, M. & Joolazadeh, S. (2014). Identification and characterization of hydrocolloid from *Cordia myxa* leaf. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 65, 215–221.
- [43] Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C., Martin Lo, Y. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydr. Polym.*, 88, 522–529.
- [44] Samavati, V., Skandari, F. (2014). Recovery, chemical and rheological characterization of gum from *Assyrian pulm.* *Int. J. Biol. Macromolec.*, 67, 172–179.
- [45] Eskandari, M., Samavati, V. (2015). Sono-assisted extraction of alcohol-insoluble extract from *Althaea rosea*: Purification and chemical analysis. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 72, 347–355.
- [46] Jooyandeh, H., Samavati, V. (2017). Extraction of crude extract from *Malva neglecta* leaves and evaluation of its free *Solvia officinalis*. *Ultrason. Sonochem.*, 4, 131–134.
- [26] Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., Chemat, F. (2010). Ultrasound assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem.*, 119(2), 851–858.
- [27] Li H., Pordesimo L., Weiss J., (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Res. Int.*, 37, 731–738.
- [28] Tahmouzi, S. (2014). Optimization of polysaccharides from Zagros oak leaf using RSM: Antioxidant and antimicrobial activities. *Carbohydr. Polym.*, 106, 238–246.
- [28] Jooyandeh, H., Noshad, M., Khamirian, R.A. (2018). Modeling of ultrasound-assisted extraction, characterization and in vitro pharmacological potential of polysaccharides from *Vaccinium arctostaphylos* L. 2017. *Int. J. Biol. Macromol.*, 107, 938–948.
- [30] Yong-guang, B., Ding-long, H., XIAO-jun, Y., Yu-min, L., Min-xia, H. (2012). Study on ultrasonic-assisted extraction of polysaccharide of *Atractylis macrocephala* koidz of experiment, *Energy Procedia*, 7, 1778–1785.
- [31] Zou, Y., Chen, X., Yang, W., Liu, Sh. (2011). Response surface methodology for optimization of the ultrasonic extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula*, *Carbohydr. Polym.*, 84, 503–508.
- [32] Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.*, 95, 588–598.
- [33] Wang, Y., Liua, Y., Hu, Y. (2014). Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.*, 93, 47–56.
- [34] Zhong, K., Wang, Q. (2010). Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.*, 80, 19–25.
- [35] Chen, W., Wang, W.P., Zhang, H. Sh., Huang, Q. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.*, 87, 614–619.

- agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99, 191–203.
- [49] Vamanu, E. (2012). Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *J. Biomed. Biotechnol.*, Article ID 565974, 1-8.
- radical scavenging activities. *Iranian Food Sci. Technol. Res. J.*, 13(1), 167-179.
- [47] Qi, H., Liu, X., Ma, J., Zhang, Q., Li, Z. (2010). In vitro antioxidant activity of acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *J. Med. Plants Res.*, 4(23), 2445-2451.
- [48] Balasundram, N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and

Extraction of polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* by ultrasound and evaluation of its antioxidant activity

Jooyandeh, H. ^{1*}, Haji-Ebrahimi Forushani, Z. ²

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani

2. MSC in Food Science and Technology

(Received: 2018/05/04 Accepted:2019/01/23)

The aim of this study was to investigate the effect of ultrasound power at 40 to 80 percent (equal to 232-464 W), extraction temperature (50 to 80 °C) and extraction time (10 to 30 min) on the soluble polysaccharide extraction from the *Pleurotus ostreatus*. The response surface methodology using Box-Behnken design (with three variables, three levels and 5 replications at central point) was applied to optimize extraction conditions and evaluation of the effects of main factors and their interactions. Antioxidant activity (scavenging ability of OH and DPPH) of extracted polysaccharide were also evaluated. Optimization of polysaccharide extraction yield using response surface methodology indicated that combination of the ultrasonic power of 58.06 percent (~337 W), extraction temperature of 65.15 °C and extraction time of 21.72 min resulted in maximum extraction yield (17.71%). Among three independent variables, ultrasonic power had the highest and temperature had the lowest impact on the rate of extraction. The results from antioxidant activity evaluation showed that even though extracted polysaccharide had lower absorbance capacity of the free radicals in comparison with control samples (ascorbic acid and BHT), but it revealed an acceptable antioxidant property.

Key words: Optimization, *Pleurotus ostreatus*, Response surface methodology, Antioxidant activity

* Corresponding author: hosjooy@asnruk.ac.ir