نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۷ شماره ۱/ سال ۱۳۹۶/ صفحات ۱۷۱ تا ۱۸۱

مطالعه ترکیبات شیمیایی ازگیل ژاپنی و استخراج پلی‌ساکارید آن به عنوان یک ترکیب ضد اکسایشی

ساره همت‌یار[۱]، محمد حجتی[*۲]، حسین جوینده[۲] و حسن برزگر[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

[۲] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

[۳] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

[*]مسئول مکاتبه: Email: hojjati@ramin.ac.ir

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی ترکیبات شیمیایی میوه و هسته ازگیل‌ژاپنی *Eriobotrya japonica* L. و استخراج پلی‌ساکارید و بررسی خواص ضداکسایشی آن است. پلی‌ساکارید با استفاده از آب گرم استخراج و با اتانول خالص سازی شد. زمان ۱۸۰ دقیقه و دمای ۹۰ ℃ شرایط مطلوب استخراج پلی‌ساکاریدها بود. همچنین نسبت آب به ماده جامد ۱:۶ و ۱:۱۰ به‌ترتیب شرایط بهینه جهت استخراج پلی‌ساکارید از میوه و هسته ازگیل بودند. دو روش مهار رادیکال DPPH و رادیکال هیدروکسیل جهت ارزیابی خواص ضداکسایشی پلی‌ساکارید استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت. باندهای مشاهده شده در آنالیز به روش FTIR تأیید کننده وجود پلی‌ساکارید به عنوان ترکیب اصلی در عصاره استخراج شده بود. نتایج نشان داد میزان قند کل پلی‌ساکارید میوه بیشتر از هسته بود. مقدار عناصر سدیم، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی موجود در میوه نسبت به هسته بیشتر بود در حالی‌که میزان عناصر منیزیوم، منگنز و مس در هسته بیشتر بود. فعالیت ضداکسایشی در هر دو نمونه و در هر دو روش اندازه‌گیری متوسط بود. در هر دو نمونه و در تمامی غلظت‌ها، فعالیت مهار رادیکال DPPH توسط اسیدآسکوربیک، بالاتر از پلی‌ساکارید استخراج شده بود. توانایی مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل توسط هر دو نمونه پلی‌ساکارید بیشتر از اسیدآسکوربیک بود در حالی‌که غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام پلی ساکارید میوه و اسیدآسکوربیک در مهار رادیکال آزاد، با یکدیگر برابر بودند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پلی‌ساکارید، توانایی مهار رادیکال‌ها افزایش پیدا نمود و در هر دو آزمون مهار رادیکال DPPH و رادیکال هیدروکسیل توانایی ضداکسایشی پلی‌ساکارید میوه از هسته بیشتر بود. بر اساس نتایج این تحقیق، پلی‌ساکارید میوه و هسته ازگیل ژاپنی می‌تواند به منظور بهبود کیفیت مواد غذایی و به واسطه داشتن خواص ضداکسایشی قابل قبول به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: ازگیل‌ژاپنی، املاح معدنی، پلی‌ساکارید، فعالیت ضداکسایش

مقدمه

وقوع هرگونه اکسیداسیون در موادغذایی نامطلوب بوده و منجر به کاهش کیفیت محصولات‌غذایی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (هراس و همکاران ۲۰۰۰). رادیکال‌های آزاد قادرند به مولکول‌های سامانه بیولوژیک بدن آسیب وارد نمایند و باعث بروز بسیاری از بیماری‌ها در موجودات زنده و بویژه انسان شوند. در سال‌های اخیر، با افزایش آگاهی نسبت به فواید مصرف ترکیبات دارای ویژگی‌های ضداکسایشی و تمایل تولیدکنندگان و مصرف-کنندگان به محصولات طبیعی، پژوهش‌های فراوانی در زمینه یافتن منابع غنی از ترکیبات ضداکسایشی طبیعی صورت گرفته‌است (گلسین و همکاران ۲۰۰۳). میوه‌ها، سبزی‌ها، ادویه‌ها و گیاهان دارویی دارای ضداکسایش‌های طبیعی می‌باشند که اغلب ماده مؤثره و فعال آن‌ها با چندین ماده دیگر مخلوط شده است (آجاگ و همکاران ۲۰۰۵). از جمله این ترکیبات پلی‌ساکاریدها می‌باشند که به طور گسترده‌ای در مواد غذایی به عنوان قوام دهنده و یا امولسیفایر استفاده می‌شود (ژو و همکاران ۲۰۱٤). گیاه ازگیل ژاپنی با نام علمی *Eriobotrya japonica* L.، متعلق به خانواده گل‌سرخیان می‌باشد. درخت ازگیل همیشه سبز و بومی مناطق جنوب شرقی چین است و در زمان‌های بسیار قدیم به ژاپنی‌ها معرفی شده است. میوه ازگیل ژاپنی با طعم و مزه بسیار مطلوب سرشار از مواد معدنی و دارای مقدار فراوانی ترکیبات ضداکسایشی از جمله فلاونوئیدها، ویتامین C، ترکیبات فنلی، پلی‌ساکاریدها و ... می‌باشد (لی و همکاران ۲۰۱۵). مشاهده شده که میوه ازگیل توانایی قابل ملاحظه‌ای در مهار رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن را دارند (پارک و همکاران ۲۰۱٤). با توجه به ارزان و در دسترس بودن آن، احتمالا پلی‌ساکارید حاصله می‌تواند جایگزین مناسبی برای پیشگیری از اکسیداسیون لیپیدها باشد.

در پژوهشی توسط زی و همکاران (۲۰۱۲) پلی‌ساکارید گیاه *Cyclocarya paliurus* بوسیله اولتراسونیک استخراج و شرایط بهینه برای استخراج پلی‌ساکارید به صورت نسبت مایع به جامد ۸ به ۱، زمان استخراج ۵۹ دقیقه و دمای استخراج $58^{\circ}C$ تعیین شد و عملکرد استخراج پلی‌ساکارید به دست آمده ۰/۱۱ ± ٤/۹۱ ٪ بود. همچنین آزمون‌ها نشان داد که پلی‌ساکارید استخراج شده به میزان ۹۲٪ توانایی مهار رادیکال DPPH و٤۳٪ مهار رادیکال‌های هیدروکسیل را دارا می‌باشد. در تحقیقی دیگر فعالیت ضداکسایشی پلی‌ساکارید استخراج شده از گیاه سرخس *Lygodium japonicum* مورد بررسی قرار گرفت و این پلی‌ساکارید توانایی خوبی در مهار رادیکال‌های پراکسید، DPPH، مهار پراکسید هیدروژن و شلاته کردن فلزات داشت. مقایسه آن با استاندارد آسکوربیک‌اسید توانایی ضداکسیداسیون خوبی را نشان داد (لی ۲۰۰٦). افشاری و همکاران (۲۰۱٤) اثر مافوق صوت، زمان استخراج، دمای استخراج و نسبت آب به ماده خام را بر عملکرد استخراج پلی ساکارید خام از برگ ختمی *Hibiscus* مورد بررسی قرار دادند و با استفاده از روش سطح پاسخ و طراحی جعبه بنکن شرایط بهینه را با عملکرد ۰/۱۸± ۹/٦٦ مشخص کردند. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی این عصاره با روش مهار رادیکال هیدروکسیل و روش مهار رادیکال DPPH بررسی گردید که فعالیت مهار قوی رادیکال‌ها را نشان داد. با توجه به اثبات خاصیت ضداکسایشی پلی‌ساکارید برخی از گیاهان و به دلیل اینکه پلی‌ساکارید گیاه ازگیل ژاپنی، مورد بررسی قرار نگرفته است، اساس این پژوهش استخراج پلی‌ساکارید از میوه و هسته ازگیل و شناسایی ساختار و بررسی خواص ضداکسایشی هسته و میوه این گیاه و مقایسه آن‌ها با یکدیگر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

میوه ازگیل ژاپنی از درختان موجود در باغات شیراز و در فصل بهار جمع آوری گردید. الکل اتانول ۹۶٪ از شرکت نصر ایران، DPPH، بافر فسفات، فروس‌سولفات، پراکسید-هیدروژن، اسیدسولفوریک، اسیدآسکوربیک، سدیم سالیسیلات، دی متیل سولفوکساید (DMSO) با خلوص ۹۹/۹٪ از شرکت سیگما آلدریچ ساخت کشورآلمان و اسید نیتریک، اسید کلریدریک، پترولیوم اتر، EDTA، بافر کلرور هیدروکسیدآمونیوم، محلول EBT، سود سوزآور ٤ نرمال (NaOH)، بوربورات آمونیوم، محلول فنل ۸۰٪، محلول D-گلوکز، اسیدبوریک، سود غلیظ، سولفات پتاسیم و محلول اسیدسولفوریک رقیق (۰/۰۵٪) از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

استخراج پلی‌ساکارید

در ابتدا جهت رفع هرگونه گرد و غبار، میوه ها با آب شستشوی سطحی شدند و سپس هسته ها از میوه جدا و هر دو نمونه ابتدا در هوای آزاد و سایه به مدت دو روز و سپس جهت حذف رطوبت اضافه، میوه‌ها در آون با دمای ۶۰±۲ ℃ به مدت ۲ روز و هسته‌ها در همین دما و به مدت ۵ ساعت خشک گردیدند. سپس نمونه‌ها به صورت پودر در آمدند. در مرحله استخراج از روش تدینی و همکاران (۱۳۹۳) و کوآن و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد. به منظور حذف چربی، قندهای آزاد و ترکیبات رنگی و پروتئین‌ها از الکل اتانول ۸۰٪ و نسبت الکل به آب ۳ به ۱ در دمای ۶۰ ℃ به مدت ۸ ساعت استفاده شد. به منظور جداسازی ترکیبات حل شده در الکل و صاف کردن محلول از پارچه صافی نایلونی استفاده شد. پس از آن باقی مانده حاصل از چربی زدایی در آون با دمای ۶۰ ℃ و به مدت ۲ ساعت خشک شد. عملیات استخراج توسط آب داغ در دماها (۶۰ ℃، ۷۵، ۹۰)، زمان‌ها (۱، ۳، ۵ ساعت) و نسبت‌های مختلف از آب به ماده خام (۱:۶، ۱:۱۰، ۱:۲۰) انجام شد و پس از صاف شدن با سرعت ۵۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای رسوب دادن پلی‌ساکاریدها از سه حجم اتانول در دمای ٤ ℃ و به مدت ٤٨ ساعت استفاده شد و رسوبات حاصل با سانتریفوژ جداسازی شدند. در نهایت پلی‌ساکارید بدست آمده در آون با دمای ۵۰ ℃ و به مدت ۱ ساعت خشک گردید. درصد راندمان پلی ساکارید استخراجی از تقسیم وزن پلی‌ساکارید خشک بدست آمده به وزن پودر اولیه و بر اساس فرمول زیر بدست آمد که W_{DP} معادل با وزن خشک پلی‌ساکارید و W_{DR} معادل با وزن خشک ماده خام می‌باشد (لی و همکاران ۲۰۱۳):

درصد راندمان استخراج= $[W_{DP} / W_{DR}] \times 100$

شناسایی خصوصیات ساختاری پلی‌ساکارید استخراج شده با روش تبدیل فوریه مادون قرمز

این امر با استفاده از دستگاه تبدیل فوریه مادون قرمز انجام شد. طبق روش لی و همکاران (۲۰۱٤) طیف تبدیل فوریه مادون قرمز از ٤۰۰ تا ٤۰۰۰ cm^{-1} با قدرت تفکیک ۰/۱ cm^{-1} و با استفاده از اسپکترومتر Tensor 27 ساخت شرکت بروکر آلمان ثبت شد.

اندازه گیری قند کل پلی‌ساکارید

قند کل نمونه‌ها با روش فنول سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد (دوبویس و همکاران ۱۹۵٦). بدین منظور ۱ گرم از پلی‌ساکارید استخراج شده رقیق و سپس ۱ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده به همراه ۵۰ میکرولیتر محلول فنل ۸۰٪ به لوله‌ها افزوده و مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول اسید سولفوریک ۹٦٪ به آن افزوده شد. سپس لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۳۰-۲۵ ℃ قرار گرفته، در نهایت میزان جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر مدل Genesys-5 ساخت شرکت اسپکترونیک آمریکا در طول موج ٤۹۰ نانومتر خوانده شد. جهت تهیه منحنی استاندارد قند کل از D-گلوکز استفاده شد.

اندازه گیری خاکستر کل

میزان خاکستر کل میوه و هسته بر اساس استاندارد AOAC به شماره ۹۲۳/۰۳ تعیین شد.

اندازه گیری مواد معدنی

جهت تعیین میزان عناصر منگنز، روی، آهن و مس از دستگاه طیف سنج جذب اتمی مدل ContrAA®300 ساخت شرکت آنالیتیک جنا کشور آلمان، برای اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم نمونه‌ها از دستگاه فلیم فوتومتر مدل CL361 ساخت شرکت الیکو استرالیا و جهت تعیین عناصر کلسیم و منیزیم از روش تیتراسیون استفاده گردید. بدین طریق که خاکستر تهیه شده از هر نمونه، به طور جداگانه بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۹۲٦٦، جهت تزریق به دستگاه‌ها آماده‌سازی و تزریق شدند.

اندازه گیری چربی خام هسته و میوه

جهت اندازه‌گیری چربی خام هسته و میوه ازگیل ژاپنی بر اساس استاندارد AOAC به شماره ۹۲۰/۳۹ و از دستگاه اتوماتیک سوکسله مدل 4XL ساخت صنایع آزمایشگاه بخشی و پترولیوم اتر به عنوان حلال استفاده گردید.

اندازه گیری میزان ازت و پروتئین هسته و میوه

میزان ازت موجود در هسته و میوه با استفاده از روش کجلدال (دستگاه اتوماتیک کجلدال مدل Kjeltec 2300 ساخت شرکت FOSS دانمارک) و بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۰۵۲ و استاندارد AOAC به شماره ۹۵۵/۰٤ انجام گرفت و برای محاسبه مقدار پروتئین خام نمونه‌ها از فاکتور ٦/۲۵ استفاده شد (اندرسون و فارکوهار ۱۹۸۲).

اندازه گیری میزان کربوهیدرات کل هسته و میوه

طبق پژوهش تسکین و همکاران (۲۰۱۱)، کربوهیدرات کل بر اساس معادله زیر محاسبه شد:

٪ کربوهیدرات کل =

۱۰۰٪ − [٪ چربی + ٪ خاکستر + ٪ پروتئین]

بررسی خصوصیات ضداکسایشی

آزمون سنجش قدرت مهار رادیکال DPPH

طبق روش جی و همکاران (۲۰۱۳) مخلوطی از محلول پلی-ساکارید در اتانول با غلظت‌های مختلف پلی‌ساکارید (۵۰،۱۰۰،۲۰۰،۳۰۰μg/mL) تهیه و به محلول ۱ میلی‌مولار در اتانول DPPH اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ ℃ گرمخانه‌گذاری شد. میزان جذب نمونه‌ها در ۳ تکرار بوسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه-گیری گردید. این جذب نشان دهنده مقدار DPPH باقی مانده یا به عبارتی احیاء نشده است. درصد بازداری DPPH در هر نمونه طبق معادله زیر محاسبه گردید. در فرمول A_1 نشان دهنده جذب نمونه و A_o بیانگر جذب کنترل است. در این آزمون از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد:

$$\text{درصد بازدارندگی}\ (\%) = 1 - \frac{A_1}{A_o} \times 100$$

آزمون تعیین قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل

برای انجام آزمون میزان قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل نمونه‌ها، مخلوطی از محلول پلی‌ساکارید در اتانول با غلظت‌های مختلف پلی‌ساکارید (۵۰،۱۰۰،۲۰۰،۳۰۰ μg/mL) تهیه و مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر غلظت با ۱ میلی‌لیتر فروس سولفات ۲ میلی‌مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم سالیسیلات ۲۰ میلی مولار مخلوط گردید و سپس به هر نمونه ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ٦ میلی‌مولار اضافه و به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۳۷ ℃ گرمخانه‌گذاری شدند. میزان جذب نمونه‌ها در سه تکرار بوسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ٥٦٢ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمون از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده و طبق معادله ذکر شده در آزمون پیشین درصد بازداری رادیکال OH در هریک از نمونه‌ها محاسبه گردید (جی و همکاران ۲۰۱۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱٦ انجام گرفت. آزمایش‌ها در ٤ تیمار و برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد و میانگین نتایج داده‌ها در مرحله استخراج از طریق آنالیز واریانس ANOVA یک‌طرفه صورت پذیرفت. میانگین‌ها در هر مرحله با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

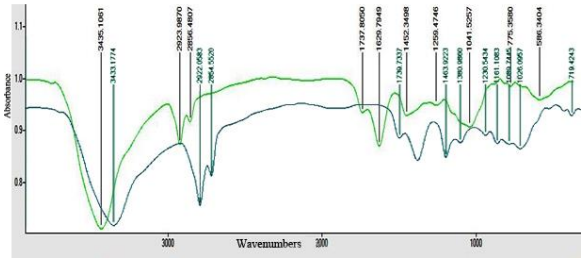
اثر دما، زمان و نسبت حلال بر راندمان استخراج

بررسی اثر متغیرها بر راندمان استخراج با داشتن ۳ متغیر (دما، زمان، نسبت آب به ماده خام) انجام گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده هر سه متغیر بر راندمان استخراج مؤثر می‌باشند. با ثابت در نظر گرفتن دو فاکتور زمان و نسبت آب به ماده خام، دما در سه بازه دمایی℃ ٦۰، ۷۵ و ۹۰ انتخاب شد و افزایش دما از ٦۰ به ۹۰ درجه، باعث افزایش استخراج پلی‌ساکارید در هر دو نمونه میوه و هسته گردید. شن و همکاران (۲۰۱٤) بر روی پلی‌ساکارید گیاه *Paris polyphylla* تحقیقی را انجام دادند و بیان نمودند که افزایش دما از ٦۰ به ۹۰ درجه موجب افزایش راندمان می‌گردد. این افزایش راندمان بر اثر دما را می‌توان متأثر از کاهش ویسکوزیته، بهبود عملکرد حلال و افزایش ضریب انتشار ماده حل شونده دانست که سبب افزایش انحلال پلی‌ساکارید در محلول و افزایش انتقال جرم می‌گردد (یه و جیانگ ۲۰۱۱). سماواتی (۲۰۱۳) بیان نمود که افزایش دما باعث بالا رفتن توانایی حلال جهت انحلال ترکیبات و کاهش ویسکوزیته حلال شده و امکان نفوذ بهتر حلال به ماتریس جامد را فراهم می‌آورد. همچنین وی عنوان نمود که میزان ارتباط بین مولکول‌های ماده جامد و مولکول‌های آب با افزایش درجه حرارت استخراج افزایش یافته و در نتیجه باعث بهبود عملکرد استخراج پلی‌ساکارید می‌شود. در مرحله بعد، زمان استخراج متغیر ۱، ۳ و ۵ ساعت در نظر گرفته‌شد. نتایج نشان داد که بهترین راندمان استخراج در زمان ۳ ساعت خواهد بود و افزایش زمان باعث کاهش و ایجاد اثر منفی بر روی راندمان خواهد بود. تدینی و همکاران (۱۳۹۳) در استخراج پلی‌ساکارید از هسته خرما نشان دادند که بهترین زمان جهت به دست آمدن بالاترین راندمان استخراج ۳ ساعت می‌باشد. کای و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند که افزایش بیش از حد زمان، می‌تواند باعث تغییر در ساختار مولکول پلی‌ساکارید گشته و کاهش راندمان استخراج را در پی داشته باشد. سماواتی (۲۰۱۳) بیان نمود که انواع مواد مختلف به زمان خاصی برای قرار گرفتن در محلول مورد نظر نیاز دارند که مایع به درون ماده اولیه نفوذ کرده و باعث حل شدن ماده اولیه می‌گردد. سپس مواد مختلف از جمله پلی‌ساکاریدها از ماده خام به بیرون منتشر می‌شوند. به نظر می‌رسد که تا زمان معین این روند افزایشی می‌باشد و پس از آن با گذشت زمان تغییری در خروج مواد ایجاد نمی‌شود. ممکن است مقداری از پلی‌ساکاریدهای استخراج شده در محیط مایع حل شده و در نتیجه کاهش میزان استخراج پلی‌ساکاریدها بر اثر گذشت زمان رخ دهد. همچنین افزایش بیش از حد زمان می‌تواند با تغییر در ساختار مولکولی پلی‌ساکارید و یا تجزیه حرارتی آن کاهش راندمان استخراج را در پی داشته باشد. فاکتور دیگر نسبت آب به ماده خام است که در این مطالعه در سه سطح ۱:٦، ۱:۱۰ و ۱:۲۰ میلی‌لیتر بر گرم در نظر گرفته شد. بیشترین بازده استخراج میوه در سطح ۱:٦ و هسته در سطح ۱:۱۰ بود. در سطح ۱:۲۰ نتیجه قابل قبولی در هر دو نمونه هسته و میوه مشاهده نگردید. ژائو و همکاران (۲۰۱۳)، علت افزایش راندمان تا نسبت معین و کاهش راندمان استخراج با افزایش بیشتر، را به این صورت شرح دادند که انتشار سریع‌تر پلی‌ساکارید در حضور بیشتر حلال باعث حل‌پذیری مولکول‌های

پلی‌ساکارید بیشتری گردیده و افزایش راندمان را در پی خواهد داشت. اما نسبت بالاتر حلال، احتمال از بین رفتن پاره‌ای از ملکول‌های پلی‌ساکارید را در طی فرآیند استخراج ایجاد می‌کند، که این عامل را باعث کاهش راندمان دانست. اثر افزایش نسبت آب به ماده خام بر استخراج پلی‌ساکارید را می‌توان به افزایش نیروی محرکه ناشی از افزایش حلال نسبت داد (سانگام وهمکاران ۲۰۱٤). همچنین به نظر می‌رسد که در غلظت‌های بالای ماده جامد در محلول استخراجی، نوعی تعادل دینامیکی بین ماده جامد و محلول برقرار گردیده که باعث کاهش انتقال جرم می‌گردد.

آنالیز ساختار پلی‌ساکارید استخراج شده با روش تبدیل فوریه مادون قرمز

برای بررسی خصوصیات ساختاری پلی‌ساکارید استخراج شده از میوه و هسته از روش FTIR استفاده شد. نتایج مربوط در شکل ۱ نشان داده شده است. لی و همکاران (۲۰۱٤) مشاهده کردند که باندها در ناحیه cm^{-1} ۲۹۳۸، ۲۹۳۰، ۲۹۳۹ و ۲۹٥٦ نشان دهنده C-H و O-H کششی است. باند مشاهده شده در cm^{-1} ۲۹۲۳ و cm^{-1} ۲۹۲۲، مربوط به پیوند C-H بوده که این باند به عنوان باند شاخص قندها محسوب می‌شود. باند جذب شده در ناحیه cm^{-1} ۱٦۲٦ نشان دهنده وجود کربونیل استر (C=O) و پیوند کششی کربوکسیل (COO^-) می‌باشد (سانگام و همکاران ۲۰۱٤). پیک موجود در باند cm^{-1} ۱۷۳۷ و ۱٦۲۹ در پلی‌ساکارید میوه و نیز باند cm^{-1} ۱۷۳۹ در پلی‌ساکارید هسته نشان دهنده (C=O) و پیوند کششی (COO^-) است. باندهای cm^{-1} ۱۷۳٦، ۱٦۲۷ و ۱٤۰٥ می‌تواند نشان دهنده وجود اورونیک اسیدها در ساختار پلی‌ساکارید باشد (وانگ و همکاران ۲۰۱۲). هر دو نمونه در پژوهش حاضر دارای اورونیک اسید می‌باشند. همچنین پیک جذب شده بین دو باند cm^{-1} ۱۲٥۰ تا ۹٥۰ نشان دهنده وجود گالاکتوز در فرم پیرانوزی است. بنابراین وجود باند در cm^{-1} ۱۰٤۱ در نمونه میوه و باند جذب شده در cm^{-1} ۱۰۲٦، ۱۰۸۹ و ۱۱٦۱ در نمونه هسته مبین وجود گالاکتوز در فرم پیرانوزی می‌باشد. عظمی و همکاران (۲۰۱۳) باندهای نزدیک به cm^{-1} ۱۰٤۷، ۱۳۲۲ و ۱۳۷۲ را مربوط به شاخه β- گلوکان می‌دانند. از این‌رو باند cm^{-1} ۱۰٤۱ و ۱٤٥۲ در پلی‌ساکارید میوه و cm^{-1} ۱۳۸۰ در پلی‌ساکارید هسته می‌تواند مربوط به این شاخه باشد. جذب در cm^{-1} ۱۱٥۳، ۱۰۷۰ و ۱۰۲٥ مبین وجود فرم α-پیرانوزی در گلوکز است (وانگ و همکاران ۲۰۱۲). جذب در cm^{-1} ۱۰۲٦ در پلی‌ساکارید هسته و cm^{-1} ۱۰٤۱ در پلی‌ساکارید میوه نشان دهنده این فرم است. به طور کلی مشاهده باندهای شاخص در ناحیه cm^{-1} ۱۰۰۰-۱۲۰۰ و ۲۹۲۳ تأییدکننده وجود پلی‌ساکارید به عنوان ترکیب اصلی و غالب در عصاره استخراج شده از پلی‌ساکارید است (عظمی و همکاران ۲۰۱۳).



شکل۱- طیف تبدیل فوریه مادون قرمز پلی‌ساکارید میوه و هسته ازگیل ژاپنی

(نمودار سیاه: میوه و نمودار سبز: هسته)

قند کل پلی‌ساکارید

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان قند کل پلی‌ساکارید میوه و هسته ازگیل ژاپنی به ترتیب ۹٦/۳۲٥ و ۹۲/٤۱ درصد است که با توجه به خالص سازی پلی‌ساکارید این نتایج قابل قبول می‌باشد.

بررسی میزان خاکستر کل و املاح معدنی

به طور متوسط هسته حدود ۲٥/٦٪ از وزن کل میوه (بر اساس وزن مرطوب) را تشکیل می‌دهد. میزان خاکستر کل،

جهت نمونه میوه ۱/۰± ۱/۷٪ و هسته ۰/۳±۲/۳٪ اندازه گیری شد که نتایج به‌دست آمده در جدول ۱ قابل مشاهده است. نتایج حاصل از بررسی میزان برخی املاح معدنی موجود در میوه و هسته ازگیل ژاپنی در جدول ۲ مشاهده می شود. املاح سدیم، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی در میوه بیشتر و بقیه املاح در هسته میزان بیشتری دارند. تمام املاح در دو نمونه دارای اختلاف معنی داری در سطح ($P < ۰/۰۵$) می‌باشند، به‌جز آهن که در دو نمونه اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P \geq ۰/۰۵$). عوامل متعددی در میزان املاح موجود درمیوه مؤثر هستند. گاریگلیو و همکاران (۲۰۰۵) بیان نمودند نقطه بنفش که مهمترین اختلال فیزیولوژیکی مؤثر بر میوه ازگیل ژاپنی می‌باشد، باعث کاهش غلظت آهن و افزایش قابل توجه غلظت پتاسیم در بافت گوشت میوه خواهد شد. همچنین در نقطه بنفش در پوست میوه، کاهش درغلظت پتاسیم، سدیم، منیزیم و آهن مشاهده گردید. علاوه بر میزان قند، نازک شدن پوست میوه نیز بر میزان املاح مؤثر است و باعث افزایش سدیم، پتاسیم و منیزیم خواهد شد.

جدول ۱- میزان ترکیبات شیمیایی میوه و هسته ازگیل ژاپنی (٪ ماده خشک)

	میوه	هسته
خاکستر	۱/۰±۷۰/۳۳	۲/۳۱±۰/۲۸
چربی	۱/۲۱±۰/۱۷	۱۴/۳۰ ±۰/۲۱
نیتروژن (کلدال)	۰/۵۸ ±۰/۱۹	۰/۹۳ ±۰/۱۰
پروتئین خام (N×6.25)	۳/۶۷±۱/۱۹	۵/۸۶ ±۰/۰۶
کربوهیدرات	۹۳/۴۲±۸/۷۰	۷۷/۵۴±۶/۰۲

میزان چربی و پروتئین و کربوهیدرات

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد میزان چربی، پروتئین و کربوهیدرات میوه به ترتیب ۱/۲، ۳/٦۷ و ۹۳/٤۲ درصد است که مقدار اندازه‌گیری شده آن‌ها بیشتر از نتایج گزارش شده توسط تیان و همکاران (۲۰۱۱) است که میزان چربی ۰/۲۰٪ پروتئین ٪٤۳ و کربوهیدرات را ۱۲/۱٤ درصد گزارش کرده‌اند. براساس جدول ۱، میزان چربی، پروتئین و کربوهیدرات هسته در این پژوهش به ترتیب ۱٤/۳، ٥/۸٦ و ۷۷/٥٤ درصد است که مقادیر چربی و کربوهیدرات آن بیشتر از نتایج پژوهش تسکین و همکاران (۲۰۱۱) است در حالیکه میزان پروتئین اندازه‌گیری شده در تحقیق حاضر کمتر از مقداری است که آنها گزارش نمودند. آن‌ها میزان پروتئین، چربی‌خام و کربوهیدرات هسته را به ترتیب ۲۲/٥ و ۳/٤ و ۷۱/۲ درصد اعلام کردند.

جدول ۲- مقادیر برخی املاح معدنی هسته و میوه ازگیل ژاپنی

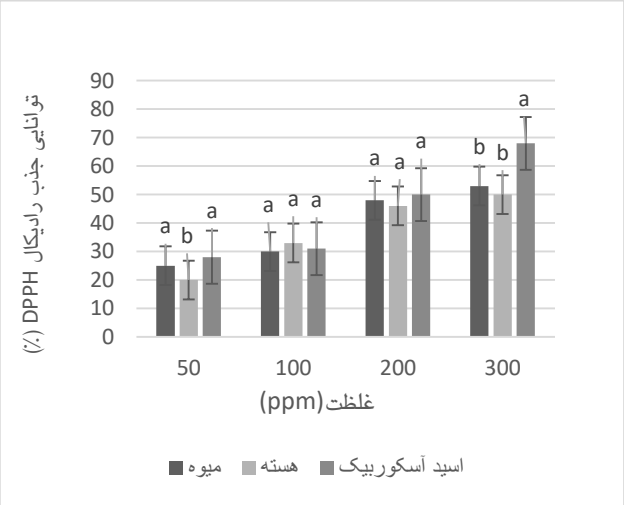
املاح معدنی	میوه	هسته
سدیم (٪)	۰/۰٦۳ ^{a}±۰/۰۲٥	۰/۰۳۱ ^{b}±۰
پتاسیم (٪)	۲/۸۸ ^{a} ±۰/۰۹٦	۱/۰۳٤ ^{b}±۰/۰۱۰
منیزیوم (٪)	۰/۱۰ ^{b} ±۰/۰۱۰	۰/۳۸ ^{a}±۰/۰٤۹
کلسیم (٪)	۰/۲۷ ^{a}±۰/۰۰۹	۰/۰۸ ^{b}±۰/۰۰٥
آهن (ppm)	٥/٤۲ ^{a}±۰/۰٤۰	٥/۰۹ ^{a}±۰/۰۰٥
روی (ppm)	۹/۱۰ ^{a}±۰/۱۰۰	۷/۲٥ ^{b}±۰/۱٥
منگنز (ppm)	٤/۸۸ ^{b}±۰/۱۱۰	۱٤/۳ ^{a} ±۰/۰۱۷
مس (ppm)	۱/٤۸ ^{b}±۰/۰٥۱	۲/۹٤ ^{a}±۰/۰۱۰

حروف غیر مشابه در ردیف افقی بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ٥ ٪ است

نتایج آزمون قدرت مهار رادیکال DPPH

DPPH یک رادیکال آزاد است که بیشترین جذب را در ٥۱۷ نانومتر از خود نشان می‌دهد. هر ترکیبی که بتواند یک هیدروژن به آن بدهد از حالت رادیکالی خارج شده و به فرم پایدار تبدیل می شود و این مساله با تغییر رنگ محلول DPPH و تغییر جذب آن مشخص می شود (شنگ و سان ۲۰۱٤). شکل ۳ نشان دهنده خاصیت مهار رادیکال DPPH است که با افزایش غلظت، شاهد افزایش قدرت مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشیم. پلی ساکارید جدا شده از میوه قادر به مهار رادیکال آزاد DPPH در حدود ٥۳٪، پلی-ساکارید هسته در حدود ٥۰٪ و اسید آسکوربیک (نمونه

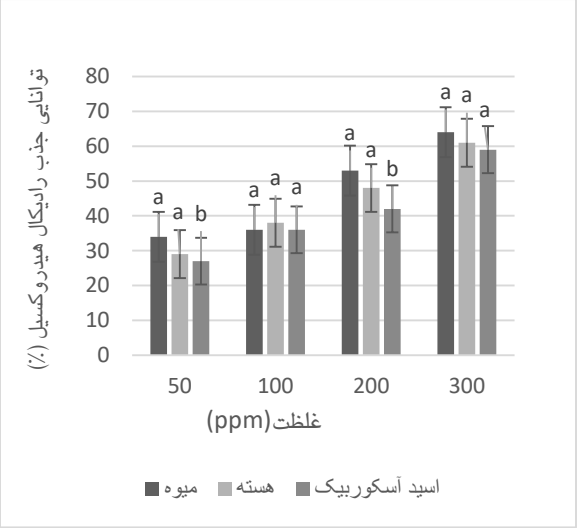
استاندارد) حدود ٦٨٪ بودند. ملاحظه گردید که هر دو نمونه پلی‌ساکارید هسته و میوه در تمام غلظت‌ها نسبت به نمونه شاهد، فعالیت ضداکسایشی کمتری داشتند و نمونه میوه عملکرد بهتری نسبت به نمونه هسته داشت. بین سه نمونه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام تفاوت معنی داری در سطح اطمینان ($p < ۰/۰۵$) مشاهده نگردید. اما در غلظت-های ۵۰ و ۱۰۰ این تفاوت معنی‌دار بود. بیشترین قدرت مهار رادیکال مربوط به غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام اسیدآسکوربیک و کمترین درصد مربط به غلظت ۵۰ پی-پی‌ام هسته است.



شکل ۲- مقایسه توانایی جذب رادیکال DPPH پلی ساکارید میوه و هسته ازگیل ژاپنی

نتایج آزمون قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل

شکل ۳ نشان دهنده خاصیت مهار رادیکال هیدروکسیل است. در غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام بین نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری در مهار رادیکال آزاد مشاهده نشد. اما در غلظت‌های ۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام بین نمونه استاندارد با دو نمونه پلی‌ساکارید تفاوت معنی‌دار گردید. با افزایش غلظت، شاهد افزایش قدرت مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشیم. در هر دو نمونه هسته و میوه، توانایی پلی‌ساکارید بیشتر از نمونه استاندارد است، به استثنای غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام میوه که برعکس است. توانایی ضداکسایشی جهت نمونه میوه ٦٤٪، هسته ٦١٪ و نمونه شاهد ٥٩٪ است. بیشترین قدرت مهار رادیکال مربوط به غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام نمونه میوه و کمترین درصد مربوط به غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام اسید-آسکوربیک است. کربوهیدرات‌ها رادیکال‌های آزاد را از طریق انتقال هیدروژن و یا به عبارتی آزاد کردن هیدروژن از پیوند C-H، مهار می‌کنند (شنگ و سان ٢٠١٤).



شکل ۳- مقایسه توانایی جذب رادیکال هیدروکسیل پلی ساکارید میوه و هسته ازگیل ژاپنی

مقایسه نتایج آزمون‌های ضداکسایشی

در اکثر پژوهش‌ها فعالیت ضداکسایشی پلی ساکاریدها را مرتبط با خصوصیات ساختاری آن‌ها از جمله نوع مونوساکاریدهای تشکیل دهنده، وزن مولکولی، نوع پیوندهای گلیکوزیدی، وجود گروه‌هایی مانند کربونیل و کربوکسیل دانسته‌اند. در هر دو آزمون ضداکسایشی قدرت میوه از هسته بیشتر است. وانگ و همکاران (۲۰۰۹) بیان نمودند میزان قند کل و سولفات می‌تواند قابلیت مهار نمونه در برابر رادیکال‌های آزاد را تحت تاثیر قرار دهد. با توجه به نتایج به دست آمده مقدار قند کل پلی‌ساکارید میوه

نسبت به هسته بیشتر است که نتایج مربوط به بالاتر بودن خاصیت ضداکسایشی میوه را تأیید می‌کند. وجود هترو-گلوکان باعث افزایش فعالیت ضداکسایشی می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز FTIR، نمونه میوه دارای باند قوی‌تر در ناحیه شاخه β-گلوکان است. بنابراین نمونه میوه دارای گلوکان بیشتری می‌باشد که این نکته بیانگر قدرت بیشتر میوه در مهار رادیکال‌های آزاد است. همچنین محتوای اورونیک اسید بیشتر در ساختار پلی-ساکارید از عوامل مؤثر بر افزایش خاصی ضداکسایشی دانسته‌اند که در این بخش باندهای مربوط به میوه از هسته قوی‌تر و بیشتر هستند. همچنین کربونیل استر (C=O) و پیوند کششی کربوکسیل (COO^-) در نمونه میوه از هسته بیشتر است که همگی تأیید کننده توانایی بیشتر پلی‌ساکارید میوه می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از FTIR نشان دهنده وجود عناصری مانند اورونیک‌اسیدها هستند که موجب افزایش قدرت ضداکسایشی می‌باشد. قدرت مهار رادیکال‌های آزاد توسط پلی‌ساکارید میوه بیشتر از هسته است و با افزایش غلظت، قدرت مهار رادیکال‌های آزاد افزایش یافت. غلظت ۳۰۰ پی-پی‌ام نمونه میوه بالاترین توانایی را در مهار هر دو رادیکال آزاد دارد و به طور کلی هر دو نمونه توانایی متوسط تا نسبتا خوبی در مهار رادیکال‌های آزاد دارند و در نتیجه از آن‌ها می‌توان به عنوان یک ضداکسایش طبیعی استفاده نمود. این بررسی نشان می‌دهد میوه و هسته ازگیل ژاپنی از نظر میزان عناصر شیمیایی در حد قابل قبولی هستند و می‌توانند به عنوان منبع خوبی از املاح معدنی و کربوهیدرات‌ها مطرح گردند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان جهت حمایت‌های مالی این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع مورد استفاده

تدینی م، شیخ زین الدین م، سلیمانیان زاد ص، ۱۳۹۳. جداسازی پلی‌ساکاریدها از هسته خرما و بررسی برخی خصوصیات فراسودمند آن، فصلنامه علوم و فناوری های نوین غذایی، دوره۱، شماره٤، صفحات ٦٠-٤٩.

Afshari K, Samavati V and Shahidi SA, 2015. Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. International Journal of Biological Macromolecules 74: 558-567.

Anderson DMW and Farquhar JGK, 1982. Gum exudates from the genus Prosopis. The International Tree Crops Journal 2: 15-24.

Azmi A, Mustafa S, Hashim DM and Manap YA, 2012. Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa levis* (Buluh beting) shoots. Molecules 17(2): 1635-1651.

Cai W, Gu X and Tang J, 2008. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. Carbohydrate Polymers 71(3): 403-410.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28(3): 350-356.

Ge Q, Huang J, Mao JW, Gong JY, Zhou YF and Huang JX, 2014. Optimization of total polysaccharide extraction from *Herba lophatheri* using RSM and antioxidant activities. International Journal of Biological Macromolecules 67: 37-42.

Gulcin I, Oktay M, Kıreccı E and Kufrevıoglu O, 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food Chemistry 83(3): 371-382.

Hras AR, Hadolin M, Knez Z and Bauman D, 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. Food Chemistry 71(2): 229-233.

Li X, Xu C and Chen K, 2015. Nutritional and Composition of Fruit Cultivars: Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). Nutritional Composition of Fruit Cultivars 371-394.

Li S and Shah NP, 2014. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. Food Chemistry 165: 262-270.

Li Q, Yu N, Wang Y, Sun Y, Lu K and Guan W, 2013. Extraction optimization of *Bruguiera gymnorrhiza* polysaccharides with radical scavenging activities. Carbohydrate Polymers 96(1): 148-155.

Li X, Zhou A and Han Y, 2006. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* in vitro. Carbohydrate Polymers 66(1): 34-42.

Ojagh SM, Sahari MA and Rezaei M, 2005. Effect of natural antioxidants on quality of common kilka (*Clupeonella Cultriventris Caspia*) during storage with ice. Journal of Marine Science and Technology 4:1-7.

Pareek S, Benkeblia N, Janick J, Cao S and Yahia EM, 2014. Postharvest physiology and technology of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture 94(80): 1495-1504.

Quan Y, Yang S, Wan J, Su T, Zhang J and Wang Z, 2015. Optimization for the extraction of polysaccharides from *Nostoc commune* and its antioxidant and antibacterial activities. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 52: 14-21.

Samavati V, 2013. Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. Carbohydrate Polymers 95(1): 588-597.

Shen S, Chen D, Li X, Li T, Yuan M, Zhou Y and Ding C, 2014. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla*. Carbohydrate Polymers 104: 80-86.

Sheng J and Sun Y, 2014. Antioxidant properties of different molecular weight polysaccharides from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. Carbohydrate Polymers 108: 41-45.

Taskin M and Erdal S, 2011. Utilization of waste loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.*)* kernel extract for a new cheap substrate for fungal fermentations. Romanian Biotechnological Letters 16: 5872-5880.

Tian S, Qin G, Li B and Yahia EM, 2011. Loquat (*Eriobotrya japonica* L.). Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits 3: 424-442.

Thangam R, Suresh V and Kannan S, 2014. Optimized extraction of polysaccharides from *Cymbopogon citratus* and its biological activities. International Journal of Biological Macromolecules 65: 415-423.

Wang R, Chen P, Jia F, Tang J and Ma F, 2012. Optimization of polysaccharides from *Panax japonicus C.A. Meyer* by RSM and its anti-oxidant activity. International Journal of Biological Macromolecules 50(2): 331-336.

Wang L, Li X and Chen Z, 2009. Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. International Journal of Biological Macromolecules 44(2): 211-214.

Xie JH, Shen MY, Xie MY, Nie SP, Chen Y, Li C, Huang DF and Wang YX, 2012. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. Carbohydrate Polymers 89(1): 177-184.

Ye CL and Jiang CJ, 2011. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica L*. by response surface methodology. Carbohydrate Polymers 84: 495- 502.

Zhao Z, Xu X, Ye Q and Dong L, 2013. Ultrasound extraction optimization of *Acanthopanax senticosus* polysaccharides and its antioxidant activity. International Journal of Biological Macromolecules 59: 290-294.

Zhou XY, Liu RL, Ma X and Zhang ZQ, 2014. Polyethylene glycol as a novel solvent for extraction of crude polysaccharides from *pericarpium granati*. Carbohydrate Polymers 101: 886-889.

Study of chemical composition of *Eriobotrya japonica* L. and extraction of its polysaccharide as an antioxidant

S Hemmatyar[1], M Hojjati[2]*, H Jooyandeh[2] and H Barzegar[3]

Received: July 23, 2016 Accepted: January 21, 2017

[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran
*Corresponding author: Email: hojjati@ramin.ac.ir

Abstract

The aim of this study is investigation of chemical composition of fruit and seed of loquat (*Eriobotrya japonica* L.), extraction of polysaccharide and evaluation of its antioxidant properties. Polysaccharide was extracted using hot water and purified by ethanol. The optimal time and temperature for the extraction of polysaccharides were 180 min and 90 ◦C, respectively. Also, the optimal ratio of water to raw materials were 6:1 and 10:1 to extract of polysaccharides from fruit and seed, respectively. The anti-oxidant activity of extracted polysaccharide was assessed by using DPPH (2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging and the hydroxyl radical methods. Bands observed in the analysis by FTIR method confirmed that polysaccharides were the main compound in the extract. The results showed the total sugar of fruit polysaccharide was more than seed polysaccharide. Also, that the content of sodium, potassium, calcium, iron and zinc from fruit were higher than seed, while the amount of magnesium, manganese and copper were higher in the seed. Anti-oxidant activity in both cases and in both methods of measurement was normal. In both cases and in all concentrations, the DPPH radical scavenging activity of ascorbic acid was higher than the extracted polysaccharide. The hydroxyl radical scavenging ability of both polysaccharides was higher than ascorbic acid; while the radical scavenging ability of 100 ppm of fruit polysaccharide and ascorbic acid were about equal. Results showed the radicals scavenging activity increased with increasing concentrations, anyway anti-oxidant activity of fruit. On the basis of the results, the extracted polysaccharides from fruit and seed of *Eriobotrya japonica* L. can be used to improve the quality of foods, due to their acceptable antioxidant activities.

Keywords: anti-oxidant activity, *Eriobotrya japonica* L., minerals, polysaccharide