مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۲ (ص۱۷۲-۱۶۵)

تأثیر روش‌های گوناگون پوست‌گیری بر برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی صمغ لوبیای خرنوب ایرانی

ساناز خلیقی[۱]، سلیمان عباسی[۲]*، محمدحسین عزیزی[۳]

۱، دانش آموخته کارشناسی ارشد ، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۲، ۳، دانشیاران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۱۲- تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۸/۲۱)

چکیده

در ایران درخت خرنوب (*Ceratonia siliqua*) به‌طور پراکنده در مناطق گوناگون کازرون و ممسنی یافت می‌شود. در این پژوهش، برخی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و شیمیایی غلاف و لوبیای خرنوب عمل‌آمده در این مناطق و تأثیر روش‌های گوناگون پوست‌گیری و خالص‌سازی بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی صمغ به‌دست‌آمده از آن، بررسی شد. برای پوست‌گیری از دو روش آبی و اسیدی (اسیدسولفوریک ۹۷ درصد، اسیدکلریدریک ۳۷ درصد و اسیداستیک گلایسیال ۱۰۰ درصد) استفاده گردید. سپس تأثیر غلظت پودر آندوسپرم (۳-۱ درصد)، pH (۴، ۷، و ۱۰)، و دما (۹۰-۵۰ درجه سلسیوس) بااستفاده از روش سطح پاسخ بر بازده استخراج و حلالیت صمغ خام استخراج‌شده، تعیین گردید، و با رسوب‌دهی فاز محلول با ایزوپروپانول، اتانول، و شستشو با استن، صمغ خالص تهیه شد. نتایج کسب‌شده از روش‌های پوست‌گیری نشان داد که کیفیت و شفافیت آندوسپرم حاصل از دو مرحله اسیدی‌کردن با اسیدسولفوریک (۴۰:۶۰) بهتر از پوست‌گیری آبی و پوست‌گیری اسیدی با اسیدکلریدریک و اسیداستیک گلایسیال است. ماده خشک فاز نامحلول با افزایش دمای انحلال، کاهش یافت.

کلیدواژگان: پوست‌گیری، خالص‌سازی، صمغ لوبیای خرنوب

مقدمه

درخت خرنوب (با نام علمی *Ceratonia siliqua* L.) از روزگاران قدیم در بیشتر کشورهای حوزه مدیترانه و در نواحی معتدل و خشک در خاک‌های ضعیف و نامرغوب رشد می‌کرد (Eshghi & Rostami, 2009). میوه خرنوب با نام نان‌سنت‌جان و هم‌چنین دانه اقاقیا هم معروف است که امروزه عمدتاً به‌جای خرنوب از واژه صمغ لوبیای اقاقیا یا Locust Bean Gum استفاده می‌شود (Avallone *et al.,* 1997).

از ۲۰۰ هزار هکتار سطح زیر کشت درخت خرنوب سالانه درحدود ۳۱۰ هزار تن میوه خرنوب تولید می‌شود، اسپانیا با تولید ۱۳۵ هزار تن در سال بزرگ‌ترین تولیدکننده خرنوب است (Eshghi & Rostami, 2009; Zografakis & Dosenakis, 2002). در ایران نیز به‌طور پراکنده در مناطق گوناگون همچون استان فارس (منطقه کازرون و شهرستان ممسنی) و استان گیلان (نوشهر) این گیاه (با نام محلی شاخ‌بزک) یافت می‌شود، اما درباره میزان میوه تولیدی اطلاعاتی در دسترس نیست (Fars– Kazeroon Forests and Ranges Organization, 2009).

اجزای اصلی بذر یا لوبیای میوه خرنوب شامل، پوست ۳۳-۳۰ درصد، آندوسپرم ۴۶-۴۲ درصد، و جوانه ۲۵-۲۳ درصد است (Eshghi & Rostami, 2009; Dakia *et al.,* 2006). آندوسپرم نوعی ماده صمغی مرکب از مانوز و گالاکتوز به نسبت ۴ به ۱ دارد به‌طوری‌که ازنظر شیمیایی نوعی پلی‌ساکارید گالاکتومانانی است (Eshghi & Rostami, 2009).

برای پوست‌گیری لوبیاها اغلب از روش‌های اسیدی یا برشته‌کردن استفاده می‌شود که در روش اول لوبیاها در اسیدسولفوریک خیسانده می‌شوند تا ضمن زغالی‌شدن، جداسازی پوسته با شستشو انجام شود، ولی در روش برشته‌کردن لوبیاها در کوره چرخانده می‌شوند تا پوست آن‌ها کنده شود (Eshghi & Rostami, 2009; Dakia *et al.,* 2006). معمولاً از هر ۱۰۰ کیلوگرم لوبیای خرنوب به‌طور متوسط حدود ۲۰ کیلوگرم صمغ غلیظ و خالص، به‌صورت پودری سفید تا سفید مایل به زرد، به‌دست می‌آید. از مهم‌ترین مشکلات تولید صمغ خالص و باکیفیت، حذف ناخالصی‌های آن است (Dakia *et al.,* 2006). روش‌های گوناگونی برای خالص‌سازی این صمغ وجود دارد که می‌توان به رسوب‌دهی در اتانول (بسیار مرسوم)، در ایزوپروپانول، با مس، باریوم، و متانول اشاره کرد (Chaabouni *et al.,* 2005). در سال ۱۹۹۰، مطالعه‌ای درباره روش

* نویسنده مسئول: sabbasifood@modares.ac.ir

خالص‌سازی صمغ لوبیای خرنوب به‌وسیله ته‌نشینی با ایزوپروپانول انجام شد، نتایج نشان داد که در نمونه‌های خالص‌سازی‌شده نسبت مانوز-گالاکتوز (M:G) و متوسط وزن مولکولی در مقایسه با نمونه‌های خام بیشتر است (Lopez da Silva & Goncalves, 1990).

در سال ۲۰۰۶ نیز در زمینه ترکیب و خصوصیات فیزیکوشیمیایی صمغ لوبیای خرنوب استخراج‌شده با روش‌های آبی و اسیدی پژوهشی انجام شد، که طبق نتایج این بررسی میزان تولید و کیفیت صمغ لوبیای خرنوب بستگی زیادی به‌روش جداسازی پوست داشت (Dakia *et al.*, 2006).

در کشور ما با این‌که پایه‌هایی از این گیاه به‌چشم می‌خورد و امروزه نهال‌گیری از آن نیز گسترش یافته است (Fars– Kazeroon Forests and Ranges Organization, 2009) ، جز چند سند علمی (Eshghi & Rostami, 2009; Darab Zadeh & Farahnaki, 2010) ، اطلاعات مستند دیگری از آن در دست نیست. بنابراین، باتوجه به دردسترس‌نبودن اطلاعات کافی درباره این گیاه و میوه آن در کشور و امکان استفاده از میوه و صمغ‌گیری از آن و کاهش هزینه واردات، تحقیق و مطالعه درباره این گیاه و صمغ آن مفید است. ازاین‌رو، اهداف پژوهش حاضر، تعیین ویژگی‌های ریخت‌شناسی و شیمیایی میوه (غلاف) خرنوب، بررسی تأثیر دما، pH، نوع و غلظت اسید استفاده‌شده روی پوست‌گیری لوبیا، و کمیت و کیفیت صمغ لوبیای خرنوب استخراج‌شده، بررسی تأثیر الکل‌ها و استن بر خالص‌سازی صمغ لوبیای خرنوب، و تعیین عمده‌ترین ویژگی‌های شیمیایی صمغ خام و خالص لوبیای خرنوب است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و مواد اولیه: میوه‌های خرنوب در اواخر مرداد سال ۱۳۸۹ از شهرستان‌های کازرون و ممسنی در استان فارس جمع‌آوری، سپس تا زمان انجام آزمون در کیسه‌های پارچه‌ای و در شرایط محیط نگهداری شدند. اسیدسولفوریک ۹۵-۹۸ درصد، اسیدکلریدریک ۳۷ درصد، اسیداستیک گلایسیال ۱۰۰ درصد، ایزوپروپانول، استن، اسیدسیتریک، و سود از شرکت مواد شیمیایی مرک آلمان تهیه شدند، هم‌چنین اتانول ۹۷ درصد از شرکت دکتر مجد در تهران خریداری شد.

ارزیابی ویژگی‌های ظاهری و شیمیایی غلاف و لوبیای خرنوب: اندازه (طول و عرض) غلاف‌ها و لوبیاها با خط‌کش و کولیس اندازه‌گیری شد. هم‌چنین، لوبیاهای جداشده ازنظر رنگ، شکل ظاهری، و نیز تعداد لوبیاهای موجود در هر غلاف بررسی شدند.

به‌منظور بررسی ویژگی‌های شیمیایی، پس از فرایند Kibbling (شکستن غلاف‌ها)، غلاف‌های خرنوب فاقد لوبیا و لوبیاهای خرنوب به‌وسیله آسیاب آزمایشگاهی (مدل ۳۲۰ Moulinex، فرانسه) و آسیاب (مدل Retsch ZM 200، آلمان) پودر شدند. برای اندازه‌گیری میزان رطوبت، مقدار ۳ گرم پودر غلاف و لوبیای خرنوب به‌ترتیب به‌مدت ۶ و ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس نگهداری و کاملاً خشک شدند (Avallone *et al.*, 1997; Dakia *et al.*, 2005). برای اندازه‌گیری میزان خاکستر از کوره ۵۵۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۲ ساعت استفاده گردید (Avallone *et al.*, 1997). مقدار چربی کل موجود در ۲ گرم از پودر غلاف و پودر لوبیا نیز در طول ۶ ساعت به‌کمک حلال پترلیوم اتر استخراج و اندازه‌گیری شد (Samil Kök, 2007). برای اندازه‌گیری میزان پروتئین، مقدار ازت موجود در ۱ گرم از پودر غلاف و پودر لوبیا ازطریق روش دستگاهی کلدال (مدل Kjeltec 8400، FOSS، دانمارک) اندازه‌گیری شد و عدد حاصل در ۶/۲۵ ضرب و درصد پروتئین به‌دست آمد. اندازه‌گیری میزان فیبر با دستگاه فیبرسنج (مدل Fibertec 1020، FOSS، دانمارک) انجام شد (Avallone *et al.*, 1997). برای گزارش میزان کربوهیدرات نیز، جمع مقادیر چربی، فیبر، پروتئین، خاکستر، و رطوبت از عدد ۱۰۰ کم شد.

پوست‌گیری لوبیای خرنوب: برای این منظور دو روش پوست‌گیری (آبی و اسیدی) بررسی شد، در روش آبی، لوبیاها در آب درحال‌جوش به‌مدت ۱ ساعت حرارت دیدند و پوسته، جوانه، و آندوسپرم به‌صورت دستی جدا شدند. در پایان، آندوسپرم به دست آمده در آون ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ ساعت خشک گردید (Dakia *et al.*, 2006).

در روش پوست‌گیری اسیدی با اسیدسولفوریک ۹۸ درصد، لوبیای خرنوب به‌مدت ۱ ساعت در مخلوط ۴۰:۶۰ اسیدسولفوریک ـ آب مقطر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس حرارت دید تا پوسته‌ها زغالی، و جدا گردند (Dakia *et al.*, 2006). اما باتوجه به پوست‌گیری ناقص لوبیاهای خرنوب ایرانی، لوبیاهای فرایندشده مجدداً به وسیله مخلوط اسیدسولفوریک - آب مقطر در نسبت‌های ۱۰۰:۰، ۷۰:۳۰، و ۴۰:۶۰ با همان شرایط مرحله قبل تیمار، و تأثیر آن‌ها بر کیفیت پوست‌گیری بررسی شد.

در روشی دیگر، لوبیاهایی که یک‌بار به‌وسیله مخلوط اسیدسولفوریک ـ آب‌مقطر به‌نسبت ۴۰:۶۰ تیمار شده بودند، این بار در مرحله دوم تحت فرایند با اسیدکلریدریک ـ آب مقطر به‌نسبت ۷۰:۳۰ و ۴۰:۶۰ قرار گرفتند. هم‌چنین در آزمایشی دیگر، تأثیر مخلوط اسیدکلریدریک ـ آب مقطر به‌نسبت ۴۰:۶۰

در مرحله اول تیمار و غلظت‌های ۷۰:۳۰ و ۴۰:۶۰ در مرحله دوم فرایند بررسی شد.

در روش دیگری، برای پوست‌گیری در مرحله اول از مخلوط اسیداستیک گلایسیال ـ آب‌مقطر به‌نسبت ۴۰:۶۰ و در مرحله دوم از مخلوط اسیدسولفوریک ـ آب‌مقطر به نسبت ۷۰:۳۰ و ۴۰:۶۰ استفاده گردید. در پایان، تمام لوبیاهای پوست‌گیری‌شده در آون ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ ساعت خشک شدند و با آسیاب Falling number (Perten، سوئد) و الک مش ۱۰ جوانه از آندوسپرم جدا شد. سرانجام آندوسپرم‌های بدون جوانه و پوسته به وسیله آسیاب آزمایشگاهی (مدل Retsch ZM 200، آلمان) خرد شدند و پودر آندوسپرم تهیه شد.

بررسی تأثیر برخی عوامل بر میزان استخراج صمغ از پودر آندوسپرم با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM): روش سطح پاسخ در برگیرنده گروهی از فناوری‌های ریاضی و آماری است که امکان رسیدن به‌شرایط بهینه در سامانه‌های پیچیده را فراهم می‌کند. این روش برای بررسی متغیرهای وابسته به چند عامل و تأثیر آن‌ها مناسب است که بررسی همزمان چند متغیر، باعث کاهش تعداد آزمون‌ها و بهبود پیش‌بینی‌های آمار و احتمالات می‌شود. با استفاده از این روش می‌توان حتی در آزمایش‌های پیچیده شرایط بهینه را تعیین نمود. از بین رایج‌ترین طرح‌های به‌کارگرفته در مطالعات RSM می‌توان به طرح مرکب مرکزی[1] اشاره کرد که این طرح شامل انواع متفاوتی است که نوع خاصی از طرح مرکب مرکزی CCF [2] نامیده می‌شود. در این طرح نقاط ستاره‌دار در مرکز هر وجه فضای فاکتوریل قرار گرفته‌اند. بنابراین $\alpha= \pm 1$ است. در این طرح هر متغیر باید سه سطح داشته باشد. طرح‌ها پیش‌بینی نسبتاً بالایی روی کل محدوده طراحی ایجاد می‌کنند و نیازی به‌استفاده از نقاط خارج از محدوده عوامل اصلی ندارند.

باتوجه به توضیحات ارائه‌شده، طرح CCF حاضر شامل ۲۰ آزمایش با ۶ تکرار در نقطه مرکزی بود و مطابق جدول (۱) تأثیر سه متغیر مستقل (دما، درصد پودر آندوسپرم، و pH) در سه سطح ($\alpha= \pm 1$)، بر دو متغیر وابسته (بازده استخراج و میزان حلالیت) ارزیابی شد (جدول ۴). تجزیه‌وتحلیل داده‌ها براساس روش‌های رایج آماری انجام شد و ترسیم منحنی‌های سطح پاسخ با نرم‌افزار Design-Expert 7.1.1 صورت گرفت.

به‌منظور تهیه پراکنش پودر آندوسپرم لوبیای خرنوب، مطابق جدول (۴)، مخلوط ۱، ۲، و ۳ درصد پودر آندوسپرم لوبیای خرنوب حاصل از روش‌های گوناگون پوست‌گیری، تهیه، و پس از هیدراته‌شدن و تعدیل pH، همچنین اعمال تیمار حرارتی (به مدت ۱ ساعت در دماهای ۵۰، ۷۰، و ۹۰درجه سلسیوس درهنگام هم‌زدن در حمام آبگرم) تهیه شد. در پایان پراکنش‌های تهیه‌شده در ۱۸۵۰۰g و دمای ۲۰درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (سانتریفیوژ مدل ۳-۳۰K Sigma، آلمان) و با جداسازی فازهای محلول و نامحلول و محاسبه درصد ماده خشک فاز نامحلول، علاوه‌بر محاسبه بازده استخراج، تأثیر عوامل ذکرشده بر حلالیت صمغ خام استخراج‌شده نیز، بررسی شد.

جدول۱. نمایش نمادها، نوع، و دامنه تغییرات استفاده‌شده برای طرح سطح پاسخ

عامل	نماد	سطوح گوناگون متغیرها		
		+۱	۰	-۱
pH	A	۱۰	۷	۴
دما (°C)	B	۹۰	۷۰	۵۰
غلظت پودر آندوسپرم (٪)	C	۳	۲	۱

خالص‌سازی صمغ خام لوبیای خرنوب: برای تهیه صمغ لوبیای خرنوب با درجه خلوص بالا، فازهای محلول صمغ لوبیای خرنوب خام با ۲ برابر حجم خود با الکل‌های اتانول، ایزوپروپانول، و یا ترکیب آن‌ها با نسبت ۵۰:۵۰ مخلوط شد و رسوب سفید پنبه‌ای‌شکلی به‌دست آمد که با استن شستشو داده شد و در آون ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شد و سرانجام ازطریق آسیاب آزمایشگاهی (مدل Retsch ZM 200، آلمان) با مش۴۰ میکرون پودر و صمغ خرنوب خالص تهیه و ویژگی‌های شیمیایی آن بررسی شد. برای ارزیابی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه 17.0 استفاده گردید.

یافته‌ها و بحث

ویژگی‌های مورفولوژیکی غلاف و لوبیاهای خرنوب: مطابق یافته‌های این بررسی، طول، عرض، و ضخامت غلاف‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق کازرون و ممسنی اختلاف زیادی با هم نداشت و دامنه آن‌ها به‌ترتیب بین ۲۷-۹، ۱/۳-۷/۰، و ۰/۴۲-۰/۳۰ سانتی‌متر متغیر بود. از نظر رنگ و شکل ظاهری نیز اغلب غلاف‌ها طویل، اندکی خمیده، و قهوه‌ای رنگ بودند. هرکدام از غلاف‌ها به‌طور متوسط حاوی ۱۲-۹ عدد لوبیای خرنوب با طول ۱-۰/۵ سانتی‌متر (میانگین ۰/۶ سانتی‌متر)، عرض ۰/۴-۰/۲ سانتی‌متر و ضخامت ۰/۲۳-۰/۱۴ سانتی‌متر، رنگ قهوه‌ای و دارای سطحی صاف بودند. در پژوهشی مشابه در سال ۲۰۰۸ انجام شد، طول لوبیاهای جمع‌آوری‌شده از مناطق گوناگون تونس بین ۰/۵۵-۰/۶۰ سانتی‌متر و ضخامت آن‌ها ۰/۳۴-۰/۴۰

1 . central composite design
2 . central composite face inscribed

سانتی‌متر گزارش شد (Naghmouchi *et al.*, 2009)، به‌نظر می‌رسد که ابعاد گونه‌های خرنوب ایرانی تا حدودی مشابه انواع مدیترانه‌ای بود.

ویژگی‌های شیمیایی غلاف و لوبیای خرنوب ایران: میزان متوسط برخی ویژگی‌های شیمیایی غلاف و لوبیای خرنوب ایرانی در جدول (۲) آورده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود ویژگی‌های شیمیایی غلاف و لوبیای خرنوب مناطق دره شاهپور (کازرون) و ممسنی اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P<0.05$). نتایج پژوهش انجام‌شده در ایتالیا نیز نشان داد که متوسط رطوبت غلاف‌ها ۵/۹ درصد، خاکستر ۱/۹ درصد، پروتئین ۱/۸ درصد، چربی ۱/۴۸ درصد، و فیبر ۲۴/۲ درصد و میزان رطوبت لوبیاهای این مناطق ۸/۹ درصد، خاکستر ۱/۱ درصد، پروتئین ۱۴/۴ درصد، چربی ۸ درصد، و فیبر ۲۸/۳ درصد بوده است (Avallone *et al.*, 1997) که مقایسه این داده‌ها با داده‌های مناطق ممسنی و کازرون بیانگر بالابودن میزان ترکیبات فیبری، چربی، خاکستر غلاف، افت رطوبت، چربی، افزایش خاکستر، و فیبر لوبیا است. این امر علاوه بر تفاوت شرایط اقلیمی و تفاوت پایه‌های خرنوب ایرانی، احتمالاً به کنترل‌نشدن شرایط رشد گیاه خرنوب ایرانی نیز مربوط می‌شود.

جدول ۲. میانگین برخی ویژگی‌های شیمیایی غلاف بدون لوبیای خرنوب و لوبیای خرنوب ایرانی (برحسب درصد)

	رطوبت		خاکستر		پروتئین		فیبر		چربی		کربوهیدرات	
منطقه جمع‌آوری	P*	B*	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B
کازرون (درهٔ شاهپور)	۵/۶±۰/۱^{b}	۷/۱±۰/۱^{a}	۳/۶±۰/۲^{a}	۳/۶±۰/۱^{a}	۱/۳±۰/۱^{b}	۱۴/۱±۰/۱^{a}	۲۶/۴±۰/۳^{a}	۳۸/۹±۰/۱^{a}	۲/۴±۰/۱^{a}	۴/۲±۰/۱^{a}	۶۰/۷±۰/۱^{a}	۳۲/۵±۰/۳^{a}
ممسنی	۶/۱±۰/۱^{a}	۷/۳±۰/۱^{a}	۳/۷±۰/۲^{a}	۳/۷±۰/۳^{a}	۱/۷±۰/۳^{a}	۱۴/۲±۰/۳^{a}	۲۶/۱±۰/۱^{a}	۳۸/۸±۰/۱^{a}	۲/۵±۰/۱^{a}	۴/۲±۰/۱^{a}	۵۹/۹±۰/۳^{a}	۳۱/۳±۰/۱^{b}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) است.

* حروف P و B به‌ترتیب نماد غلاف بدون لوبیای خرنوب ایرانی و لوبیای خرنوب ایرانی هستند.

تأثیر روش‌های گوناگون پوست‌گیری بر برخی ویژگی‌های کیفی و شیمیایی آندوسپرم لوبیای خرنوب: در روش آبی، میزان بازده آندوسپرم معادل ۴۷/۸ درصد وزن خشک لوبیا بود و آندوسپرم‌های به‌دست‌آمده نسبتاً شفاف و شکنندگی مطلوبی داشتند. نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش انجام‌شده در بلژیک نیز تأییدکننده بازده زیاد روش پوست‌گیری آبی (حدود ۶۱-۵۱ درصد) بود (Dakia *et al.*, 2006). کاهش بازده در تحقیق حاضر در مقایسه با نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش انجام‌شده در سال ۲۰۰۶، احتمالاً در اثر بالابودن میزان فیبر در گونه‌های ایرانی (حدود ۳۹ درصد) درمقایسه با گونه‌های مدیترانه‌ای (حدود ۲۹ درصد) است، و شاید کنترل‌نشدن شرایط رشد گیاه و کیفیت پایین خرنوب‌های مناطق جنوبی ایران نیز، دلیلی دیگر است.

یافته‌های حاصل از پوست‌گیری با اسیدها نیز نشان داد که پوست‌گیری ۲ مرحله‌ای با مخلوط اسیدسولفوریک ـ آب‌مقطر (نسبت ۴۰:۶۰)، پوست‌گیری را به بهترین شکل انجام داد و بازده آندوسپرم حاصل حدود ۴۱ درصد بود. در پژوهشی هم که در سال ۲۰۰۶ در همین زمینه انجام شد، با پوست‌گیری یک‌مرحله‌ای به‌وسیله اسیدسولفوریک ۹۸ درصد ـ آب‌مقطر با نسبت ۴۰:۶۰، به بازده آندوسپرم حدود ۴۸-۳۷ درصد دست‌یافتند که آندوسپرم حاصل نیز مانند نمونه‌های پوست‌گیری‌شده، با روش این تحقیق، به‌علت تأثیر اسید بر رنگدانه‌های آندوسپرم، شفاف و سفیدتر از آندوسپرم به‌دست‌آمده از روش آبی بود (Dakia *et al.*, 2006). روش‌های پوست‌گیری با مخلوط اسیدسولفوریک ـ آب‌مقطر (نسبت ۴۰:۶۰) در مرحله اول و تیمار با مخلوط اسیدکلریدریک ـ آب‌مقطر (نسبت ۷۰:۳۰) در مرحله دوم و پوست‌گیری ۲ مرحله‌ای با اسیدکلریدریک ـ آب‌مقطر با نسبت ۴۰:۶۰ هم نشان داد که آندوسپرم حاصل، از نظر کیفیت پوست‌گیری نمی‌توانست با تیمار ۲ مرحله‌ای با اسیدسولفوریک ـ آب‌مقطر با نسبت ۴۰:۶۰ رقابت کند. تیمار با اسیداستیک ـ آب‌مقطر (نسبت ۴۰:۶۰) در مرحله اول و اسیدسولفوریک ـ آب‌مقطر در نسبت‌های ۴۰:۶۰ در مرحله دوم، پوست‌گیری را با بازده حدود ۴۴ درصد انجام دادند و آندوسپرم حاصل شفاف، سفید، و با شکنندگی مطلوب بود. نتایج نشان‌دهنده این مطلب بودند که بازده روش‌های استخراج با اسیدهای گوناگون تقریباً مشابه است و تأثیر این اسیدها بر بازده پوست‌گیری چندان زیاد نبود.

میزان برخی ویژگی‌های شیمیایی پودر آندوسپرم در جدول (۳) آورده شده است. در پژوهش انجام‌شده در بلژیک، درصد رطوبت، خاکستر، چربی، و پروتئین برای روش آبی به‌ترتیب ۶/۵ درصد، ۱/۵ درصد، ۱/۵ درصد، و ۷/۴ درصد گزارش شد، که برای آندوسپرم پوست‌گیری‌شده با روش اسیدی میزان رطوبت ۵/۹ درصد، خاکستر ۰/۷ درصد، پروتئین ۵/۲ درصد، و چربی ۱/۳ درصد به‌دست آمد (Dakia *et al.*, 2005; Dakia *et al.*, 2006). مقایسه نتایج جدول (۳) بیانگر بالا بودن چربی و خاکستر در نمونه‌های آبی، و پروتئین، چربی، و خاکستر در نمونه‌های اسیدی است که احتمالاً علت آن را می‌توان به اختلاف ویژگی‌های لوبیاهای ایرانی در مقایسه با نمونه‌های مدیترانه‌ای، به‌علت شرایط اقلیمی متفاوت، جداسازی ناقص جوانه، و مسائلی از این دست نسبت داد.

جدول ۳. تأثیر روش‌های جداسازی پوست بر برخی ویژگی‌های شیمیایی پودر آندوسپرم لوبیای خرنوب (برحسب درصد)

روش جداسازی پوست / نوع ترکیب	رطوبت	خاکستر	چربی	پروتئین	کربوهیدرات
آب جوش به‌مدت ۶۰ دقیقه	۵/۹±۰/۳۰ a	۲/۲±۰/۳۳ a	۳/۲±۰/۱۰ d	۶/۴±۰/۱۲ d	۸۴/۶±۰/۱۱ a
اسیدسولفوریک-آب‌مقطر (نسبت ۴۰:۶۰) ۲مرحله‌ای	۴/۷±۰/۱۲ b	۱/۷±۰/۲۰ b	۳/۹±۰/۱۵ ab	۷/۵±۰/۱۷ b	۸۲/۲±۰/۱۸ b
اسیدکلریدریک-آب‌مقطر (نسبت ۴۰:۶۰) ۲مرحله‌ای	۴/۵±۰/۱۰ c	۱/۵±۰/۱۱ b	۳/۷±۰/۱۰ b	۷/۷±۰/۳۰ a	۸۲/۶±۰/۲۰ b
ترکیب اسیدسولفوریک-آب‌مقطر (نسبت ۴۰:۶۰) در مرحله اول و اسیدکلریدریک-آب‌مقطر (نسبت ۳۰:۷۰) در مرحله دوم	۴/۶±۰/۲۳ c	۱/۶±۰/۱۰ b	۳/۵±۰/۱۴ c	۷/۱±۰/۱۱ c	۸۲/۵±۰/۲۰ b
ترکیب اسیداستیک-آب‌مقطر (نسبت ۴۰:۶۰) در مرحله اول و اسیدسولفوریک-آب‌مقطر (نسبت ۴۰:۶۰) در مرحله دوم	۴/۷±۰/۲۵ a	۱/۵±۰/۱۹ b	۴/۱±۰/۲۱ a	۷/۱±۰/۳۲ c	۸۲/۶±۰/۱۵ b

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) است.

جدول ۴. تأثیر برخی عوامل (غلظت، دما، و pH) بر وزن خشک فاز محلول و نامحلول پراکنش پودر آندوسپرم لوبیای خرنوب حاصل از روش‌های گوناگون پوست‌گیری (برحسب درصد)

طرح مرکب مرکزی			آبی		۲مرحله اسیدسولفوریک		۲مرحله اسیدکلریدریک		ترکیب اسیدسولفوریک و اسیدکلریدریک		ترکیب اسیداستیک و اسیدسولفوریک	
آزمایش	A*	B*	C*	*S	*IS	S	IS	S	IS	S	IS	S
۱	۰	-۱	۰	۵۳±۲/۲ g	۴۴±۱/۱ h	۵۳±۲/۱ g	۴۵±۱/۲ hi	۶۲±۲/۱ kl	۳۶±۱/۵ f	۸±۱/۳ u	۹۰±۱/۲ r	۶۵±۱/۴ no
۲	۰	۰	-۱	۵۹±۱/۳ ij	۳۸±۲/۳ g	۶۹±۱/۴ pq	۲۹±۱/۸ d	۵۸±۲/۴ ij	۳۹±۱/۶ g	۲۰±۱/۲ v	۷۸±۲/۱ no	۵۳±۱/۸ g
۳	-۱	+۱	-۱	۵۷±۱/۱ hi	۴۰±۲/۰ g	۵۷±۱/۷ hi	۴۰±۲/۲ g	۵۷±۱/۹ hi	۴۱±۱/۸ g	۱۹±۱/۵ v	۷۸±۲/۵ no	۵۸±۲/۳ ij
۴	-۱	-۱	+۱	۴۴±۱/۰ c	۵۳±۱/۶ j	۴۵±۱/۲ c	۵۳±۱/۹ j	۳۴±۱/۴ b	۶۴±۱/۱ m	۱±۰/۶ w	۹۷±۲/۲ t	۳۹±۱/۲ bc
۵	۰	۰	+۱	۷۳±۲/۴ s	۲۴±۲/۱ ab	۶۵±۱/۰ mn	۳۳±۲/۱ ef	۶۹±۱/۸ pq	۲۹±۱/۴ d	۱۹±۱/۴ v	۷۸±۲/۵ no	۷۳±۱/۶ s
۶	-۱	-۱	-۱	۲۸±۱/۴ a	۶۹±۲/۶ mn	۳۳±۲/۱ b	۶۵±۱/۸ m	۳۲±۱/۷ b	۶۶±۱/۵ m	۵±۱/۶ uw	۹۳±۲/۱ s	۴۰±۱/۸ bc
۷	۰	۰	۰	۶۹±۱/۷ pq	۲۸±۱/۸ d	۶۰±۱/۰ ij	۳۸±۱/۱ g	۶۶±۱/۳ no	۳۲±۱/۹ e	۱۱±۱/۴ x	۸۵±۱/۹ p	۷۳±۲/۲ s
۸	۰	۰	۰	۶۹±۱/۵ pq	۲۸±۱/۱ d	۵۹±۱/۷ ij	۳۹±۱/۷ g	۶۶±۱/۱ no	۳۱±۱/۲ de	۱۲±۲/۵ x	۸۵±۱/۳ p	۷۲±۱/۱ s
۹	-۱	۰	۰	۵۲±۲/۰ fg	۴۵±۲/۳ h	۴۹±۱/۴ de	۴۸±۲/۲ i	۵۸±۲/۰ ij	۴۰±۱/۵ g	۱۷±۲/۰ vx	۸۱±۱/۷ o	۶۴±۱/۸ lm
۱۰	+۱	-۱	-۱	۶۱±۱/۱ jk	۳۶±۱/۵ f	۶۶±۱/۱ no	۲۹±۱/۹ d	۶۴±۱/۰ lm	۳۴±۱/۷ ef	۲۱±۱/۵ v	۷۷±۱/۳ n	۵۶±۱/۴ h
۱۱	۰	+۱	۰	۷۳±۱/۴ ef	۲۵±۲/۱ bc	۶۶±۱/۱ no	۳۲±۲/۰ e	۶۹±۱/۹ pq	۲۹±۱/۲ d	۱۸±۲/۲ vx	۸۰±۱/۶ no	۷۶±۱/۳ st
۱۲	+۱	+۱	-۱	۵۱±۱/۵ ef	۴۶±۱/۸ hi	۴۷±۲/۲ cd	۵۰±۱/۶ ij	۴۲±۲/۱ bc	۵۶±۱/۹ jk	۵±۱/۳ uw	۹۳±۲/۴ s	۴۴±۱/۹ c
۱۳	+۱	+۱	+۱	۶۸±۲/۱ pq	۳۰±۲/۰ d	۷۰±۱/۵ qr	۲۸±۲/۱ d	۶۴±۱/۱ lm	۳۴±۱/۸ ef	۹±۱/۴ u	۸۹±۱/۸ qr	۵۸±۲/۱ ij
۱۴	+۱	-۱	+۱	۵۵±۱/۸ g	۴۲±۱/۱ gh	۴۹±۱/۷ de	۴۸±۲/۰ i	۵۰±۱/۴ f	۴۸±۲/۱ g	۳±۱/۱ w	۹۴±۱/۴ s	۵۱±۱/۹ fg
۱۵	۰	۰	۰	۶۸±۱/۹ op	۲۹±۱/۸ d	۶۰±۱/۹ ij	۳۸±۱/۹ g	۶۵±۱/۳ mn	۳۳±۱/۹ ef	۱۴±۱/۳ x	۸۴±۲/۱ p	۷۲±۲/۴ s
۱۶	+۱	+۱	-۱	۷۹±۱/۲ t	۱۹±۱/۶ u	۸۰±۱/۲ t	۱۸±۲/۲ u	۷۳±۱/۷ s	۲۵±۱/۲ bc	۳۷±۲/۳ bc	۶۱±۱/۹ l	۷۸±۱/۶ t
۱۷	۰	۰	۰	۶۷±۲/۴ no	۲۹±۱/۹ d	۵۹±۱/۴ ij	۳۸±۱/۶ g	۶۷±۲/۶ no	۳۱±۱/۱ de	۱۱±۱/۱ x	۸۶±۱/۴ pq	۷۳±۱/۲ s
۱۸	+۱	۰	۰	۵۴±۱/۹ gh	۴۳±۲/۱ h	۴۷±۲/۰ cd	۵۰±۱/۸ ij	۴۸±۲/۲ e	۵۰±۱/۳ ij	۳±۱/۳ w	۹۴±۱/۷ s	۴۹±۱/۸ ef
۱۹	۰	۰	۰	۷۰±۲/۱ qr	۲۸±۲/۰ d	۵۸±۲/۲ ij	۳۸±۱/۹ g	۶۶±۱/۱ no	۳۲±۱/۴ e	۱۲±۱/۱ x	۸۵±۱/۰ p	۷۲±۱/۳ s
۲۰	۰	۰	۰	۶۹±۲/۶ pq	۲۸±۱/۸ d	۵۹±۱/۹ ij	۳۸±۱/۲ g	۶۶±۱/۵ no	۳۲±۲/۱ e	۱۳±۲/۵ x	۸۵±۱/۴ p	۷۳±۲/۰ s

* علامت‌های اختصاری A، B، C، S، و Is به‌ترتیب بیان‌گر pH، دما، غلظت صمغ، ماده خشک فاز محلول (بازده استخراج صمغ خام)، و ماده خشک فاز نامحلول‌اند/ حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) است.

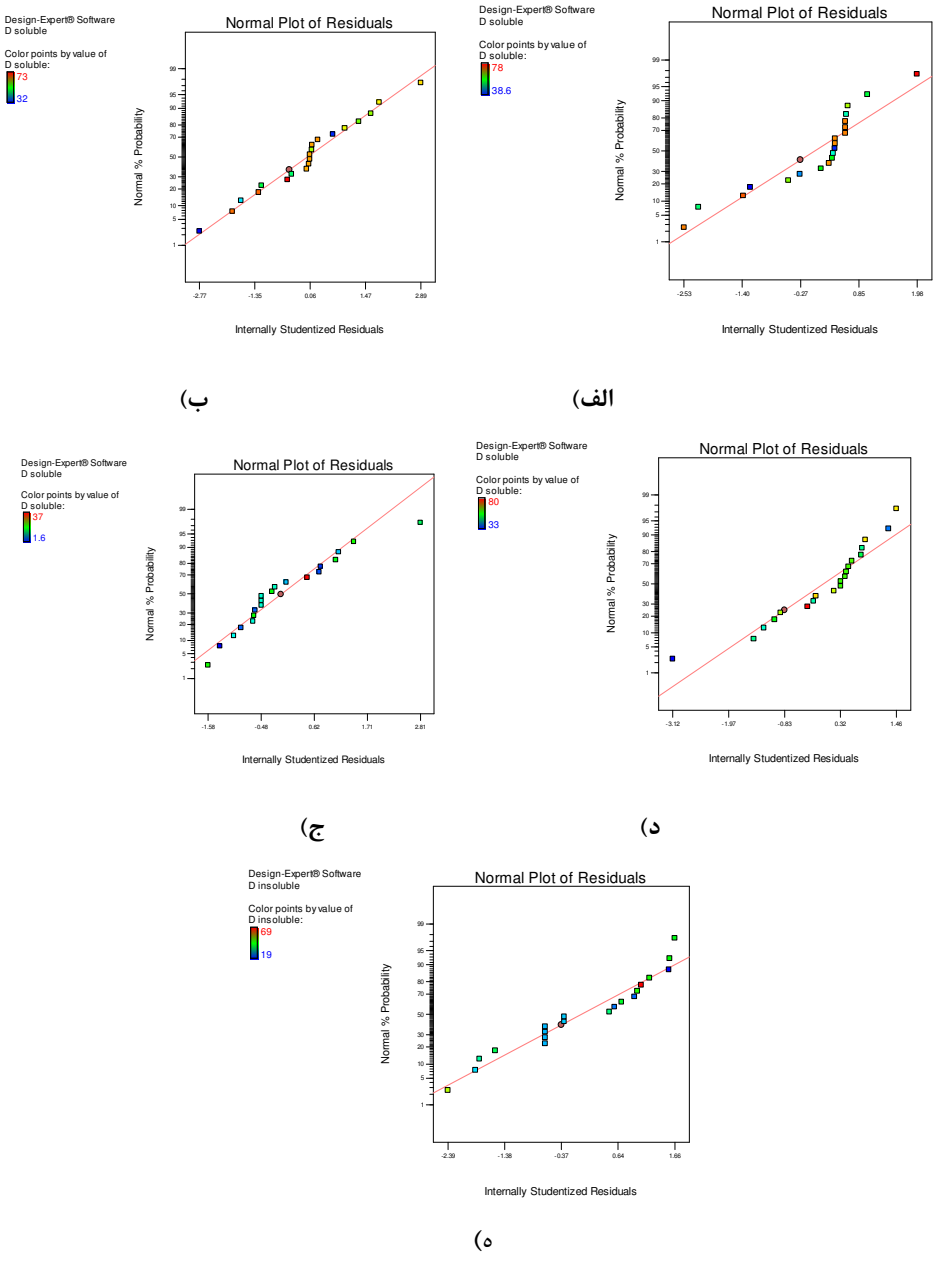
بهینه‌سازی شرایط استخراج صمغ از پودر آندوسپرم با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM):

رابطه ۱ مدل عمومی چندجمله‌ای درجه دوم را برای بازده استخراج صمغ خرنوب خام نشان می‌دهد:

(رابطه ۱)

$$Y= a+ a_1A + a_2B + a_3C + a_{12}AB + a_{13}AC + a_{23}BC + a_{11}A^2 + a_{22}B^2 + a_{33}C^2$$

در این معادله A، B، و C به ترتیب مربوط به pH، دما، و غلظت پودر آندوسپرم، a_1، a_2، و a_3 ضرائب متغیرهای خطی، a_{12}، a_{13}، a_{23}، a_{11}، a_{22}، و a_{33} ضرایب متغیرهای غیرخطی، AB، AC، و BC تأثیر متقابل، A^2، B^2، و C^2 به‌ترتیب تأثیر درجه دوم‌اند. Y نشانگر بازده صمغ خرنوب خام پیش‌بینی‌شده به وسیله مدل است. شایان ذکر است که ضرایب این معادله پس



شکل ۱. نمودار داده‌های تجربی مربوط به بازده در برابر داده‌های پیش‌بینی‌شده به‌وسیله مدل: الف) ترکیب اسیداستیک و اسیدسولفوریک، ب) دو مرحله اسیدکلریدیک، ج) دو مرحله اسیدسولفوریک، د) ترکیب اسیدسولفوریک و اسیدکلریدریک، ه) آبی

از تجزیه‌وتحلیل با نرم‌افزار Design Expert به‌دست آمدند و با قراردادن این ضرایب، رابطه‌های ۲ تا ۶ (معادلات کلی بازده صمغ خام خرنوب حاصل از روش‌های متفاوت پوست‌گیری آبی و اسیدی) به‌دست آمدند:

(رابطه ۲) خرنوب پوست‌گیری‌شده با روش آبی

$$Y=۶۷/۲۵ + ۱۰/۴۰\ A + ۸/۵۰\ B - ۱/۲۰\ C - ۰/۶۲\ AB - ۳/۳۷\ AC - ۳/۳۷\ BC - ۲/۶۴\ A^۲ - ۱/۱۴\ B^۲ - ۸/۶۴C^۲$$

(رابطه ۳) خرنوب پوست‌گیری‌شده با روش ۲ مرحله‌ای اسیدسولفوریک

$$Y= ۵۷/۵۵ + ۱۰/۷۶\ A + ۷/۶۷\ B - ۵/۳۱\ C - ۰/۰۹\ AB - ۰/۹۹\ AC - ۱/۰۲\ BC - ۲/۰۱\ A^۲ - ۰/۲۱\ B^۲ - ۱۰/۰۶\ C^۲$$

(رابطه ۴) خرنوب پوست‌گیری‌شده با روش ۲مرحله‌ای اسیدکلریدریک

$$Y= ۶۶/۱۱ + ۹/۶۱\ A + ۶/۳۷\ B - ۴/۶۸\ C - ۱/۰۹\ AB - ۰/۹۹\ AC - ۱/۶۶\ BC - ۲/۲۱\ A^۲ - ۰/۲۱\ B^۲ - ۱۲/۰۶\ C^۲$$

(رابطه ۵) خرنوب پوست‌گیری شده با روش ترکیب اسیداستیک و اسیدسولفوریک

$$Y= ۷۱/۵۰ + ۷/۰۴ A + ۶/۳۴ B - ۴/۳۵ C + ۰/۶۳ AB - ۱/۲۰ AC - ۳/۴۵ BC - ۰/۶۹ A^۲ - ۰/۶۹ B^۲ - ۱۷/۵۴ C^۲$$

(رابطه ۶) خرنوب پوست‌گیری‌شده با روش ترکیب اسیدسولفوریک و اسیدکلریدریک

$$Y= ۱۲/۸۴ + ۴/۰۵ A + ۵/۰۴ B - ۷/۸۴ C + ۰/۴۵ AB - ۳/۱۲ AC - ۳/۲۰ BC + ۳/۴۵ A^۲ - ۰/۸۰ B^۲ - ۲/۶۰ C^۲$$

میزان ضریب تعیین (R^2) روابط ۲ تا ۶ به‌ترتیب ۰/۹۶۷۸، ۰/۸۵۹۸، ۰/۹۴۹۶، ۰/۹۷۵۶ و ۰/۹۷۲۲ بود. شایان ذکر است که R^2 نشان‌دهنده میزان انحراف یا نزدیکی داده‌ها از رگرسیون و به‌عبارتی بیانگر توانایی مدل در پیشگویی نتایج است به‌این ترتیب، رگرسیون به‌خوبی توانسته است رابطه بین متغیرهای مستقل (pH، دما و غلظت) را نشان دهد و پیش‌بینی کند. بااستفاده از روابط گفته‌شده می‌توان میزان بازده صمغ خام را برای لوبیاهای خرنوب پوست‌گیری‌شده با روش‌های آبی و اسیدی پیش‌بینی کرد. شکل (۱) نیز میزان تطابق داده‌های تجربی دربرابر پاسخ پیش‌بینی‌شده مدل را نشان می‌دهد.

همان‌گونه که در جدول (۴) مشاهده می‌شود، در تمامی نمونه‌ها ارتباط بین بازده صمغ خام با دما و pH مستقیم و بیشینه بازده استخراج صمغ خام دماهای بالاتر و pHهای قلیایی است. همان‌گونه که داکیا و همکاران نیز به‌اثبات رساندند، حلالیت پودر آندوسپرم خرنوب با افزایش دما، افزایش می‌یابد (Dakia *et al.*, 2006). باتوجه به نتایج ارائه شده در جدول (۴) و با درنظرگرفتن این نکته که ویژگی‌های ظاهری (رنگ) پراکنش‌های پودر آندوسپرم خرنوب در دمای حدود ۷۰ درجه سلسیوس و pH اسیدی مطلوب‌تر بود، بنابراین، شرایط بهینه تولید پراکنش پودر آندوسپرم لوبیای خرنوب برای استخراج صمغ خام، با روش طرح مرکب مرکزی (CCF) برای روش‌های پوست‌گیری گوناگون به‌صورت جدول (۵) به دست آمد. پودر آندوسپرم خرنوب پوست‌گیری‌شده با روش ترکیب اسیدکلریدریک و اسیدسولفوریک حلالیت مناسبی نداشت و مخلوطی ۲ فاز تولید می‌کرد، درنتیجه این روش پوست‌گیری حذف گردید.

خالص‌سازی صمغ خام لوبیای خرنوب: بررسی ویژگی‌های شیمیایی صمغ‌های خالص‌سازی‌شده با ترکیب اتانول ـ ایزوپروپانول (نسبت ۱:۱) به‌همراه شستشوی نهایی با استن در جدول ۶ آورده شده است. محلول صمغ خالص‌سازی‌شده با این روش بسیار شفاف‌تر از کاربرد هریک از الکل‌ها به‌تنهایی بود. در مرحله خالص‌سازی، کلیه چربی‌ها، و فیبرها حذف ، پروتئین و خاکستر نیز کاهش می‌یابد. بعد از انجام این مرحله، محلول صمغ حاصل شفاف‌تر و پایدارتر می‌گردد (Lopes da Silva & Goncalves, 1990).

جدول ۵. شرایط بهینه استخراج صمغ خرنوب خام (به‌روش CCF)

روش پوست‌گیری / متغیرها	آبی	۲مرحله اسیدسولفوریک	۲ مرحله اسیدکلریدریک	ترکیب اسیداستیک و اسیدسولفوریک
دما (°C)	۷۰	۷۱/۰۷	۷۰	۷۰
غلظت پودر آندوسپرم (درصد)	۲/۰۹	۲	۱/۸۵	۱/۹۰
pH	۴/۵	۴/۵	۴	۴/۵

جدول ۶. برخی ویژگی‌های شیمیایی صمغ خرنوب خالص‌سازی‌شده با ترکیب اتانول-ایزوپروپانول (۱:۱) و استن (برحسب درصد)

ترکیب / روش پوست‌گیری	آبی	۲ مرحله اسیدسولفوریک	۲ مرحله اسیدکلریدریک	ترکیب اسیداستیک و اسیدسولفوریک
رطوبت	۴/۳±۰/۲۰ ^{b}	۵/۵±۰/۲۰ ^{a}	۵/۵±۰/۲۰ ^{a}	۴/۳±۰/۲۰ ^{b}
خاکستر	۰/۸±۰/۰۴ ^{ab}	۰/۹±۰/۰۵ ^{a}	۰/۷±۰/۰۴ ^{b}	۰/۶±۰/۰۴ ^{c}
چربی	۰/۵±۰/۰۵ ^{b}	۰/۹±۰/۰۵ ^{a}	۰/۵±۰/۰۵ ^{b}	۰/۱±۰/۰۵ ^{c}
پروتئین	۲/۶±۰/۱۰ ^{b}	۲/۹±۰/۲۰ ^{a}	۲/۸±۰/۲۰ ^{a}	۲/۹±۰/۱۰ ^{a}
کربوهیدرات	۹۱/۸±۰/۱۰ ^{a}	۸۹/۸±۰/۱۰ ^{c}	۹۰/۵±۰/۲۰ ^{b}	۹۱/۱±۰/۱۰ ^{a}

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد ($p < ۰/۰۵$) است.

نتیجه‌گیری کلی: نتایج نشان داد که ویژگی‌های ریخت‌شناسی و شیمیایی غلاف‌ها و لوبیاهای خرنوب حاصل از مناطق جنوبی کشور اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P<0.05$). هم‌چنین نتایج حاصل از روش‌های پوست‌گیری نشان داد که آندوسپرم به‌دست‌آمده از دو مرحله اسیدی‌کردن با اسیدسولفوریک (۴۰:۶۰) شفاف‌تر از آندوسپرم حاصل از سایر روش‌های پوست‌گیری بود. با افزایش دما از ۵۰ به ۹۰ درجه سلسیوس، حلالیت پودر آندوسپرم افزایش یافت، هم‌چنین

خالص‌سازی با ترکیب الکل‌های اتانول ـ ایزوپروپانول (۱:۱) و شستشوی نهایی با استن بهترین نتیجه را داد. بازده این صمغ قبل از مرحله خالص‌سازی، برای نمونه‌های حاصل از پوست‌گیری آبی ۴۲/۸ درصد و برای نمونه‌های پوست‌گیری‌شده با اسیدها ۳۴/۶ درصد به‌دست آمد که پس از خالص‌سازی برای نمونه‌های آبی به حدود ۳۵ درصد و برای نمونه‌های اسیدی ۳۰ درصد کاهش یافت.

REFRENCES

Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M. & Monazani, A. (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis,* 10, 166-172.

Chaabouni, M. M., Thonart, P., Chekki, R., Chebil, L., Zgoulli, S., Khaldi, A. and Bouzouita, N. (2005). The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chemistry,* 101, 1508-1515.

Dakia, P. A., Wathelet, B. and Paquot, M. (2005). Isolation and chemical evaluation of carob seed germ. *Food Chemistry,* 102, 1368-1374.

Dakia, P. A., Blecker, C., Robert, C., Wthelet, B., and Paquot, M. (2006). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre‐treatment. *Food Hydrocolloids,* 22, 807-818.

Darab Zadeh, N., and Farahnaki, A. (2010). The comparison of physicochemical and rheological properties between Iranian and commercial carob bean gum. In proceedings of *19th National Congress on Food Science and Technology,* 12–13 Nov., Tehran University, Tehran-Iran, pp. 141-142. (In Farsi)

Eshghi, S., & Rostami, A. A. (2009) *Carob Tree* (1st ed.). Tehran: Vizhe Negar. (In Farsi)

Fars–Kazeroon Forests and Ranges Organization. (2009). *Carob Bean Breeding Project.* Retrieved July 19, 2009, from http://www.frw.org.ir. (In Farsi)

Lopes da Silva, J. A. and Goncalves, M. P. (1990). Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids,* 4, 277-287.

Naghmouchi, S., Khouja, M. L., Romero, J. and Boussaid, M. (2009). Tunisian carob populations: Morphological variability of pods and kernels. *Scientia Horticulturae,* 121, 125-130.

Samil Kök, M. (2007). A comparative study on the compositions of crude and refined locust bean gum: In relation to rheological properties. *Carbohydrate Polymers,* 70, 68-76.

Zografakis, N., and Dosenakis, D. (2002). Studies on the exploitation of carob for bioethanol production. *Biomass in Mediterranean,* 4, 238-248.