

شاپا: ۴۱۶۱-۱۷۳۵

عنوان مقالات

- ۲۰۱ بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از روش مخلوط و
بررسی اثر ضد میکروبی آن بر *Escherichia coli* و *Enterococcus faecium* و *Listeria innocua*
بهروز علیزاده بهبهانی، علی الغونه، فریده طباطبایی یزدی، فخری شهیدی، محبت محبی
- ۲۱۴ بررسی ویژگی‌های بافتی میوه گلابی طی فرآیند خشک کردن در خشک کن قفسه‌ای
محمد مهدی حیدری فروشانی، سید مهدی نصیری
- ۲۲۶ بررسی اثر شرایط خشک کردن در خشک کن کابینتی و پیش تیمارهای
مختلف بر شدت خشک شدن انگور و ویژگی‌های کیفی کشمش
اعظم ایوبی، ناصر صداقت، مهدی کاشانی نژاد، محبت محبی، مهدی نصیری محلاتی
- ۲۳۹ پایداری اکسایشی تری آسیل گلیسرول روغن ماهی کیلکا (*Clupeonella cultiventris caspia*)
تحت تأثیر روغنهای مغز و پوست بنه و اجزاء صابونی ناشونده آنها
سمانه پژوهان مهر، رضا فرحوش، رضا اسماعیل زاده کناری، علی شریف
- ۲۵۰ مقایسه برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سه ژنوتیپ زرشک بومی استان سمنان
محمد فرهادی چیتگر، مهدی وریدی، محمدجواد وریدی، احمد بالندری
- ۲۶۱ اثر غلظت‌های مختلف لستین- کسترویل بر خصوصیات اندازه ذرات، پتانسیل زتا، کارایی و پایداری
درون پوشانی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین A پالمیتات
بابک قنبرزاده، اکرم یزشکی، حامد همیشه کار، محمد مقدم
- ۲۷۶ اثر ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن علیه
Escherichia coli و *Listeria innocua* طی نگهداری سالاد الویه
محبوبه کشیری
- ۲۸۶ بررسی تأثیر اسانس‌های ریحان و مریم گلی کبیر بر رشد *Listeria monocytogenes*
و *Aspergillus flavus* در پنیر سفید ایرانی
مریم عزیزخانی، فهیمه توریان، مریم بربری
- ۲۹۶ مقایسه خواص ضد اکسایشی زرشک تازه *Berberis (integerrima × Vulgaris)* در حلال‌های آبی و الکلی
فریده شریفی، لطفه پورا کبیر
- ۳۰۸ مدل سازی رهایش ترکیبات موثره‌ی نانوریز پوشانی شده‌ی زعفران از فاز داخلی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب
افشین فریدی اسفنجانی، سید مهدی جعفری، الهام اسدپور، حبیب‌الله میرزایی
- ۳۱۸ بررسی حضور قارچ‌های مولد آفات توکسین در پسته منطقه خراسان (شهرستان‌های گناباد و فیض آباد)
با استفاده از روش مولکولی
نسیم پورابراهیم، مسعود یاورمنش
- ۳۳۰ بررسی ویژگی‌های رئولوژیکی و حسی موس شکلاتی حاوی سدیم کازئینات و ژلاتین
سعید میرعرب رضی، محبت محبی، محمدحسین حداد خداپرست، آرش کوچکی

نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران

با شماره پروانه ۱۲۴/۸۴۷ و درجه علمی - پژوهشی شماره ۳/۱۱/۸۱۰ از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
۸۸/۵/۱۰

خرداد - تیر ۱۳۹۵

شماره ۲

جلد ۱۲

درجه علمی - پژوهشی این نشریه طی نامه ۳/۱۱/۴۷۶۷۳ از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تا سال ۱۳۹۳ تمدید شده است.
۹۰/۴/۱۴

صاحب امتیاز: گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
مدیر مسئول: دکتر هاشم پورآذرنگ
سر دبیر: دکتر سید محمد علی رضوی
کارشناس امور اجرایی: دکتر مسعود تقی زاده
اعضای هیات تحریریه:

دکتر محمدرضا احسانی
دکتر هاشم پورآذرنگ
دکتر محمدباقر حبیبی نجفی
دکتر اصغر خسروشاهی
دکتر مرتضی خمیری
دکتر سید محمد علی رضوی
دکتر محمد علی سحری
دکتر فخری شهیدی
دکتر ناصر صداقت
دکتر عسگر فرحناکی
دکتر رضا فرهوش
دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز
دکتر مهدی کاشانی نژاد
دکتر مهدی کدیور
دکتر سید علی مرتضوی
دکتر محمدجواد وریدی

استاد، تکنولوژی لبنیات، دانشگاه تهران
استاد، شیمی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، میکروبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، تکنولوژی لبنیات، دانشگاه ارومیه
دانشیار، میکروبیولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
استاد، مهندسی و خواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، شیمی مواد غذایی، دانشگاه تربیت مدرس
استاد، میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دانشیار، بسته بندی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دانشیار، مهندسی و خواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه شیراز
استاد، شیمی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، میکروبیولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
دانشیار، مهندسی و خواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دانشیار، شیمی مواد غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان
استاد، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
دانشیار، تکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

ناشر: گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد چاپ: مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد
شمارگان: ۲۵۰ نسخه قیمت: ۵۰۰۰ ریال (دانشجویان ۲۵۰۰ ریال)

نشانی: مشهد - کد پستی ۹۱۷۷۵ صندوق پستی ۱۱۶۳

دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی - گروه علوم و صنایع غذایی - دفتر نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران.

تلفن: ۲۰-۸۷۹۵۶۱۸ داخلی ۳۲۱ نامبر: ۸۷۸۷۴۳۰

این نشریه در پایگاههای زیر نمایه شده است:

پایگاه استنادی علوم ایران (ISC)، پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID)، بانک اطلاعات نشریات کشور (MAGIRAN)

پست الکترونیکی: ifstrj@um.ac.ir

این نشریه در سایت http://jm.um.ac.ir/index.php/food_tech/index به صورت مقاله کامل نمایه شده است.

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

مندرجات

- ۲۰۱ بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از روش مخلوط و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر *Enterococcus*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli* و *faecium*
بهر روز علیزاده بهبهانی، علی الغونه، فریده طباطبایی یزدی، فخری شهیدی، محبت محبی
- ۲۱۴ بررسی ویژگی‌های بافتی میوه گلایی طی فرآیند خشک کردن در خشک کن قفسه‌ای
محمد مهدی حیدری فروشانی، سید مهدی نصیری
- ۲۲۶ بررسی اثر شرایط خشک کردن در خشک کن کابینتی و پیش تیمارهای مختلف بر شدت خشک شدن انگور و ویژگی‌های کیفی کشمش
اعظم ایوبی، ناصر صداقت، مهدی کاشانی نژاد، محبت محبی، مهدی نصیری محلاتی
- ۲۳۹ پایداری اکسایشی تری آسپیل گلیسرول روغن ماهی کیلکا (*Clupeonella cultiventris caspia*) تحت تأثیر روغنهای مغز و پوست بنه و اجزاء صابونی ناشونده آنها
سمانه پژوهان مهر، رضا فرحوش، رضا اسماعیل زاده کناری، علی شریف
- ۲۵۰ مقایسه برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سه ژنوتیپ زرشک بومی استان سمنان
محمد فرهادی چیتگر، مهدی وریدی، محمدجواد وریدی، احمد بالندری
- ۲۶۱ اثر غلظت‌های مختلف لستین - کلسترول بر خصوصیات اندازه ذرات، پتانسیل زتا، کارایی و پایداری درون پوشانی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین A پالمیتات
بابک قنبرزاده، اکرم پزشکی، حامد همیشه کار، محمد مقدم
- ۲۷۶ اثر ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن علیه *Escherichia coli* و *Listeria innocua* طی نگهداری سالاد الویه محبوبه کشیری
- ۲۸۶ بررسی تأثیر اسانس‌های ریحان و مریم گلی کبیر بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز و آسپرژیلوس فلاووس در پنیر سفید ایرانی
مریم عزیزخانی، فهیمه توریان، مریم بریری
- ۲۹۶ مقایسه خواص ضد اکسایشی زرشک تازه (*Berberis (integerrima × Vulgaris)*) در حلال‌های آبی و الکلی
فریده شریفی، لطیفه پوراکبر
- ۳۰۸ مدل‌سازی رهائش ترکیبات موثره‌ی نانوریز پوشانی شده‌ی زعفران از فاز داخلی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب
افشین فریدی اسفنجانی، سید مهدی جعفری، الهام اسدپور، حبیب‌الله میرزایی
- ۳۱۸ بررسی حضور قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در پسته منطقه خراسان (شهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد) با استفاده از روش مولکولی
نسیم پورابراهیم، مسعود یاورمنش
- ۳۳۰ بررسی ویژگی‌های رئولوژیکی و حسی موس شکلاتی حاوی سدیم کازئینات و ژلاتین
سعید میرعرب رضی، محبت محبی، محمدحسین حداد خداپرست، آرش کوچکی

بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از روش مخلوط و بررسی اثر ضد میکروبی

Escherichia coli و *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* بر آن

بهروز عزیزاده بهبهانی^۱، علی الفگونه^۲، فریده طباطبایی یزدی^{۳*}، فخری شهیدی^۴، محبت محبی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۰۶

چکیده

در این پژوهش اثر حلال‌های آب، اتانول، متانول و گلیسرین هر کدام در پنج سطح (صفر، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌لیتر) با استفاده از هندسه مخلوط برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا استفاده شد. از مدل چندجمله‌ای شرف و بهینه‌سازی عددی به منظور مدل‌سازی و بهینه‌سازی عصاره استفاده گردید. مدل چند جمله‌ای شرف به‌طور معنی‌داری قادر به پیش‌بینی بازده حاصل از استخراج عصاره برگ حرا می‌باشد (میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۴ و ۰/۸۴ و غیر معنی‌دار بودن آزمون ضعیف برازش و مقدار اندیس F (۱۴/۶۲) نشان دهنده صحت مدل برای پیش‌بینی بازدهی عصاره می‌باشد). به علاوه میزان ضریب تغییرات ۱۴/۶٪ محاسبه شد که نشان دهنده تکرار پذیری قابل قبول برای داده‌های آزمایشی است. میزان تابع مطلوبیت بهینه‌سازی ۰/۹۴ محاسبه شد که نشانگر صحت عملیات بهینه‌سازی می‌باشد. بر این اساس، فرمولاسیون بهینه حاوی گلیسرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول (۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود. اثر ضد میکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا بر سه باکتری *Escherichia coli* ATTC 25992 و *Enterococcus faecium* ATTC 51559 و *Listeria innocua* ATTC 33090 به سه روش (انتشار در آگار به کمک دیسک، حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد و حداقل غلظت کشندگی) در هشت غلظت مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین اثر بازدارندگی بر *Listeria innocua* و بالاترین میزان مقاومت در برابر عصاره، مربوط به *Escherichia coli* بود، همچنین با افزایش غلظت عصاره‌ها قطر هاله بازدارندگی بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: حرا، بهینه‌سازی، هندسه مخلوط، اثر ضد میکروبی

مقدمه

مدل‌نمایش ساده‌ای از یک سیستم پیچیده است. اصولاً با مدل‌سازی می‌توان حرکات و واکنش‌های یک سیستم حقیقی را به سادگی در اختیار گرفت. یک مدل با صحت بالا به کاربر اجازه به دست آوردن خصوصیات، پیش‌بینی کارایی فرآیند و هم‌چنین بهینه‌سازی فرآیند را می‌دهد (Ruguo, 1999). توسعه تکنیک‌های موفق مدل‌سازی، منجر به کاهش لزوم آزمایش‌های تجربی و در نتیجه صرفه جویی در زمان و هزینه در توسعه مراحل فرآیند می‌گردد.

سیستم‌های هوشمند، ابزار مناسبی برای مدل‌سازی فرایندهای پیچیده طبیعی می‌باشند. این سیستم‌ها با پردازش مستقیم داده‌های تجربی دانش یا قانون نهفته در ورای داده‌ها را مشخص می‌نمایند. در حقیقت این مدل‌ها تنها سیستم را توصیف می‌کنند (Razavi et al., 2003).

یکی از این سیستم‌های هوشمند روش سطح پاسخ می‌باشد. متدولوژی رویه‌ی پاسخ (RSM) که برای نخستین بار توسط باکس و ویلسون (۱۹۵۱) معرفی شد سیستمی هوشمند می‌باشند، که با به کارگیری مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی، شبیه‌سازی سیستم‌های خطی و غیر خطی را انجام می‌دهد. در حقیقت روش سطح پاسخ یک ابزار مفید برای زمانی است که سیستم به طور کامل ناشناخته می‌باشد این تکنیک دارای هندسه‌های متنوعی است که از جمله آن می‌توان به روش مخلوط^۶ اشاره نمود (Xie et al., 2003).

۱ و ۲- دانشجویان دکترا گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳، ۴ و ۵- استادان گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول: (Email: tabatabai@um.ac.ir)

یافت می‌شود. این باکتری از لحاظ ظاهری، یک باکتری گرم مثبت میله‌ای شکل می‌باشد، که توانایی تحمل دما و غلظت بالای نمک را دارد. از آنجا که باکتری *L. innocua* ویژگی‌های فیزیولوژیکی مشابهی با *L. monocytogenes* دارد و تنها تفاوت آن‌ها قابلیت بیماری‌زایی در *L. monocytogenes* است لذا در این پژوهش آزمایشگاهی از *L. innocua* استفاده شد (Banada et al., 2007).

Enterococcus faecium باکتری گرم مثبت، کروی می‌باشد که جایگاه فعالیت آن دستگاه گوارش انسان و سایر پستانداران است. *E. faecium* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج (Aminoglycosides, Aztreonam, Cephalosporins, Clindamycin, Nafcillin, Oxacillin) نسبتاً مقاوم است و باعث ایجاد عفونت به ویژه در بیمارستان‌ها، خانه سالمندان و ... می‌شود. *E. faecium* می‌تواند باعث ایجاد باکتریی و اندوکاردیت عفونت دستگاه ادراری (UTI) و عفونت‌های دیگر در انسان شود (Gonzales et al., 2001).

Escherichia coli باسیل گرم منفی، متحرک، بی‌هوازی اختیاری و غیر تشکیل‌دهنده اسپور است. این باکتری در شرایط بی‌هوازی، مخلوطی از اسیدها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی‌اکسید کربن تولید می‌کند. رشد بهینه باکتری *E. coli* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است اما تا دمای ۴۹ درجه را نیز تحمل کرده و به رشد خود ادامه می‌دهد و می‌تواند عامل بیماری‌های عفونی در انسان باشد (Barrick et al., 2009).

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ترکیب نسبت‌های متفاوت از حلال‌های گلیسیرین، اتانول، متانول و آب بر میزان بازدهی عصاره‌ی برگ گیاه حرا با استفاده از روش سطح پاسخ با هندسه بهینه مخلوط، بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا و در انتها بررسی اثر مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های برگ گیاه حرا بر میکروارگانیسم‌های *L. innocua* ATTC 33090 و *E. faecium* ATTC 51559 در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش

جمع‌آوری برگ گیاه حرا

این پژوهش آزمایشگاهی در فاصله آبان ماه ۱۳۹۱ تا شهریور ماه ۱۳۹۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. برگ‌های تازه گیاه حرا در شهریور ماه ۱۳۹۱ از جزیره قشم (استان هرمزگان) جمع‌آوری و بعد از شناسایی و تایید نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی و هماهنگی‌های لازم با هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، در شرایط مناسب (سایه) خشک گردید و جهت تهیه

روش مخلوط به شکل موفقیت‌آمیزی در صنایع غذایی به کاربرده شده است که می‌توان به، بهینه‌سازی فرمولاسیون تورتیلیای حاوی آرد گندم، لوبیای چشم بلبلی و بادام‌زمینی (Holt et al., 2006)، بهینه‌سازی فرمولاسیون دسرهای خشک حاوی شیرین کننده (Lop et al., 1999)، بهینه‌سازی محیط کشت میکروبی برای تولید فراورده کفیر (Zhou et al., 2007)، بررسی اثر متقابل بین صمغ لوبیای لوکاست و نشاسته سیب‌زمینی و کاپاکاراگینان بر ویژگی‌های بافتی و رنگی سوسیس کم چرب اشاره نمود (Garcia & Totosaus, 2008).

یکی از روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی می‌باشد. اما همواره استفاده از این گونه مواد شیمیایی در مواد غذایی باعث نگرانی بوده است، زیرا اعتقاد عمومی مردم بر این است که مواد شیمیایی ضد میکروبی ممکن است سلامت آن‌ها را تهدید نماید. به همین دلیل استفاده از مواد طبیعی بجای مواد شیمیایی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. بدون هیچ‌گونه تردیدی استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان طبیعی جایگزین بسیار مناسبی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی هستند (Dorman & Deans, 2000; Matan et al., 2006).

گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* متعلق به خانواده اوسیناسه معروف به مانگروی سفید یا خاکستری می‌باشد. گیاه حرا در حد فاصل خشکی و دریا و در نواحی جزر و مد رشد می‌کند. گیاه حرا بعنوان یکی از غالب‌ترین گونه‌های گیاهی اکوسیستم مانگرو دارای توانایی‌های بالقوه‌ای می‌باشد. این گیاه به صورت بوته‌ای یا درختچه‌ای با ارتفاع‌های متغیر بین ۱ تا ۱۰ متر یافت می‌شود (Kathiresan & Bingham, 2001).

علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۲)، اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا را بر *Penicillium digitatum* و *Alternaria citri* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های برگ گیاه حرا دارای اثر بازدارندگی موثری بر هر دو گونه قارچ مورد بررسی داشت. اثر بازدارندگی عصاره بر قارچ *Penicillium digitatum* بیشتر بود.

مطالعات فیتوشیمیایی انجام شده روی عصاره برگ گیاه حرا وجود متابولیت‌های ثانویه نظیر تانین‌ها، آلکالوئیدها، استروئیدها، فلاونوئیدها، نفتوکینون‌ها، گلیکوزیدها و سایر ترپن‌ها را گزارش کرده که انتظار می‌رود این ترکیبات با فعالیت زیستی خود باعث اثر ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا شوند (Zhu et al., 2009).

مطالعات توکسیکولوژی انجام شده توسط محققان روی موش‌های آزمایشگاهی، هیچ گونه اثر منفی استفاده از عصاره برگ حرا را بر موش‌ها گزارش نموده اند (Ali & Bashir, 1998).

Listeria innocua یکی از شش گونه متعلق به جنس لیستریا می‌باشد، که به‌طور گسترده در محیط به ویژه خاک و منابع غذایی

عصاره با آسیاب مدل Waring پودر شد.

سپس از عصاره تغلیظ شده ۱ میلی‌لیتر به لوله اضافه و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجدداً تعیین شد. اختلاف وزن لوله معادل با وزن ۱ ml از عصاره‌های آبی یا اتانولی بود. میانگین سه بار تکرار، به‌عنوان وزن خشک عصاره محاسبه گردید (Tabatabaei Yazdi *et al.*, 2013).

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا با استفاده از روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها کشت داده شد سپس دیسک‌های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی‌متر) با غلظت‌های (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌ها در آب مقطر استریل تهیه و به عصاره حرا آغشته گشت و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شد و با کمی فشار روی محیط کشت ثابت گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از خط کش به‌طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام گرفت (Babayi *et al.*, 2004).

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد

حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، این روش برای عصاره‌ها و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد (Benger *et al.*, 2004).

تعیین حداقل غلظت کشندگی

حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای برای عصاره‌های برگ گیاه حرا تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد

سوش‌های میکروبی

سوش‌های میکروبی مورد بررسی در این پژوهش شامل 33090 *E. coli* و *E. faecium* ATTC 51559 *L. innocua* ATTC 25992 بود. تمامی سوش‌ها بصورت لیوفلیزه از طرف دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران اهدا گردید. آمپول‌های لیوفلیزه باکتری‌ها در شرایط استریل باز و به محیط کشت مایع مولر هیلتون برات (مرک آلمان) انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هر میکروارگانیسم بود. بنابراین ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار نوترینت آگار تلقیح انجام پذیرفت، سپس کشت مربوطه توسط محلول رینگر شستشو و سوسپانسیون میکروبی تهیه گردید. مقداری از این سوسپانسیون میکروبی در لوله آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کدورت آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد. سوسپانسیون تولیدی باید حاوی 1×10^8 CFU/ml باکتری باشد (Tabatabaei Yazdi & Alizadeh Behbahani, 2013; Valero & Salmeron, 2003).

تهیه عصاره‌ها

جهت تهیه عصاره‌ها (آبی، اتانولی، متانولی و گلیسرینی) ۵۰ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه حرا به ارلن حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال‌های مختلف اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط گردید تا استخراج عصاره بطور کامل انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی جنس واتمن از هم جدا شد تا عصاره‌های اولیه بدست آید. مایع رویی پس از جمع‌آوری با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس از صافی 0.45μ عبور داده و جهت حذف آلودگی‌های میکروبی از فیلتر سرنگی استفاده شد و در نهایت عصاره‌های اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) گردید و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. عصاره‌های تغلیظ شده در ظروف تیره استریل آلومینیومی ریخته شد و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2013; Heidari, 2013; Sureshjani *et al.*, 2013).

بررسی وزن خشک عصاره‌ها

برای محاسبه وزن خشک، برای هر کدام از عصاره‌ها یک لوله آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس (۰/۰۰۰۱) توزین،

روش بهینه‌سازی

افزایش راندمان فرایند بدون افزایش هزینه دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. روش به کار رفته بدین منظور، بهینه‌سازی نامیده می‌شود. در این پژوهش بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال بر مبنای مدل برازش شده و با استفاده از تابع مطلوبیت صورت پذیرفته است. الگوریتم بهینه‌سازی در این روش بدین ترتیب می‌باشد که ابتدا هر یک از متغیرهای مورد بررسی به یک تابع مطلوبیت (d) تبدیل می‌شوند، برد تغییرات تابع مطلوبیت بین صفر تا یک می‌باشد. در این روش تابع مطلوبیت بعنوان یک تابع پناالتی عمل می‌کند و پاسخ را به سمت ناحیه مطلوب میل می‌دهد. هدف این روش جستجوی پاسخ‌های مربوطه در فضایی می‌باشد که تابع مطلوبیت سراسری به یک نزدیک شود. تابع مطلوبیت سراسری در واقع، میانگین هندسی تک تک توابع مطلوبیت می‌باشد و با استفاده از (معادله ۳) محاسبه می‌شود (Pourfarzad et al., 2012). لازم به یادآوری است که روش پناالتی نوعی الگوریتم بهینه‌سازی می‌باشد که اساس آن خارج کردن محدودیت از مساله است.

$$D = (d_1 * d_2 * d_3 * \dots * d_m)^{1/m}$$

جدول ۱- فرمولاسیون‌های مختلف حلال، برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا

کد تیمار	آب	اتانول	متانول	گلیسرین
۱	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵
۲	.	۱۲۵	۱۲۵	.
۳	.	.	۲۵۰	.
۴	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵
۵	۱۲۵	۱۲۵	.	.
۶	.	۱۲۵	۱۲۵	.
۷	۱۲۵	.	۱۲۵	.
۸	.	۲۵۰	.	.
۹	.	.	۱۲۵	۱۲۵
۱۰	۲۵۰	.	.	.
۱۱	.	۱۲۵	.	۱۲۵
۱۲	.	.	.	۲۵۰
۱۳	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵
۱۴	۱۲۵	.	.	۱۲۵
۱۵	۱۲۵	۱۲۵	.	.
۱۶	۱۲۵	.	.	۱۲۵
۱۷	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵
۱۸	.	۱۲۵	.	۱۲۵
۱۹	۸۳/۳۳	.	۸۳/۳۳	۸۳/۳۳
۲۰	۱۲۵	.	۱۲۵	.

میکروارگانیزم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، از تمام لوله‌هایی که هیچ رشدی در آن‌ها مشاهده نشده بود، جهت تعیین MBC کشت به عمل آمد. لوله‌ای که کم‌ترین غلظت عصاره را داشت و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد. این روش برای هر عصاره و هر میکروارگانیزم ۳ بار تکرار گردید (Espinell et al., 2002).

طرح آماری

در این پژوهش به منظور مطالعه‌ی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره گیاه حرا، اثر آب، اتانول، گلیسرین و متانول هر کدام در ۵ سطح (صفر، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌لیتر) با استفاده از طرح آزمایشی مخلوط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی فرمولاسیون‌ها نسبت حلال به برگ گیاه حرا ۵ به ۱ بود. طرح شامل بیست آزمایش بوده که ۱۰ آزمایش مربوط به تخمین ضرایب مدل، پنج آزمایش مربوط به آزمون ضعف برازش، پنج آزمایش برای محاسبه خطای تصادفی در نظر گرفته شده است. یکی از مزایای روش مخلوط وارد کردن محدودیت دلخواه در انتخاب نقاط مورد آزمایش می‌باشد. همچنین نوع بهینه این روش می‌تواند ماتریسی از نقاط آزمایشی را ایجاد کند که در آن دترمینان ماتریس مینیمم باشد، این ویژگی امکان استخراج حداکثر اطلاعات را از فضای آزمایشی مهیا می‌سازد (Ruguo, 1999).

در این پژوهش به منظور مدل‌سازی بازدهی استخراج از چند جمله‌ای شف (معادله ۱) استفاده گردید، این معادله فرم مشتق شده بسط تیلور می‌باشد، که به علت رابطه خاص (معادله ۲) میان n جزء در یک هندسه مخلوط به وجود آمده است (Ruguo, 1999).

$$y = \sum_{j=1}^n \beta_j \cdot X_j + \sum_{j < k=2}^n \beta_{jk} \cdot X_j \cdot X_k + \sum_{j < k < l=2}^n \beta_{jkl} \cdot X_j \cdot X_k \cdot X_l \quad (1)$$

$$X_i + X_j + X_k + \dots + X_n = 1 \quad (2)$$

در معادلات مذکور y بعنوان پاسخ در نظر گرفته شده و β_j ضرایب جملات خطی، β_{jk} ضرایب جملات غیر خطی دوتایی و β_{jkl} ضرایب جملات غیر خطی سه‌تایی، بعلاوه از X بعنوان اثرات خطی مخلوط، و XX، XXX بعنوان اثرات غیر خطی مخلوط به صورت دوتایی و سه‌تایی استفاده شده است. همچنین برای بررسی اثر ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا از هر یک از تیمارهای یاد شده در قسمت فوق در هشت سطح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) محلولی تهیه شده و اثر ضد میکروبی آن را روی سه باکتری *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli* در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته است. برای بررسی آنالیز واریانس و میزان معنی‌داری ($p < 0.05$) اثرات ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا از نرم افزار Minitab 16 استفاده گردید.

نتایج و بحث

از جمله معضلات شایع در سالیان اخیر مساله مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد، لذا یافتن ترکیبات ضد میکروبی طبیعی با کم‌ترین اثر جانبی امر لازم و ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به شکل‌های ۱ و ۲، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در یک نسبت ثابت از گلیسرین با نزدیک شدن به نقطه مرکزی هندسه آزمایش، میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش پیدا کرده است. همچنین با توجه به شکل‌های ۳ و ۴، در یک میزان ثابت از متانول با افزایش حلال گلیسرین میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافته است، و بیشترین میزان بازدهی را می‌توان در سطوح برابر آب و اتانول به دست آورد.

علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۲)، اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و گلیسرین برگ گیاه حرا را بر *Penicillium*

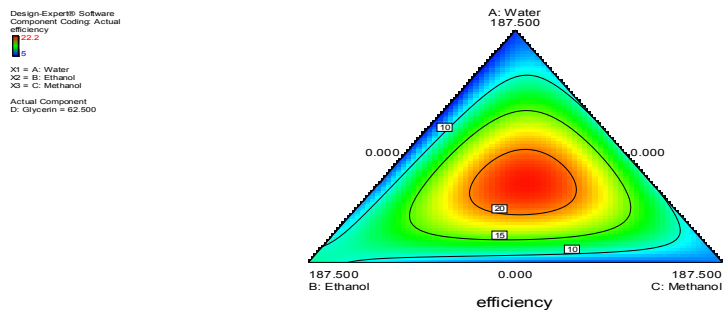
digitatum مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهشگران نشان داد که کمترین میزان بازده عصاره مربوط به حلال گلیسرین می‌باشد این محققان علتی برای وقوع این پدیده عنوان نمودند. شاید بتوان علت این پدیده را افزایش قطبیت کل حلال در زمان افزایش حضور حلال گلیسرین در فرمولاسیون دانست. به‌منظور بررسی فرضیه فوق از آزمون آماری مربع پی‌رسون برای مشخص کردن میزان همبستگی درجه استحصال و قطبیت استفاده شد. نتایج حاصل بیان‌گر رابط معکوس و معنی‌داری ($p < 0.05$) بین دو متغیر فوق بوده است (جدول ۳). همچنین برای بررسی میزان صحت مدل برازش شده بر داده‌های حاصل از درجه استحصال عصاره برگ گیاه حرا از دو فاکتور آماری ضریب تبیین و آزمون ضعف برازش استفاده گردید. میزان ضریب تبیین ۹۴ درصد و همچنین عدم معنی‌داری ($p < 0.05$) آزمون ضعف برازش بیان‌گر مناسب بودن مدل شف برای برآورده داده‌ها می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج جدول آنالیز واریانس مدل برازش یافته بر داده‌های درجه استحصال عصاره برگ گیاه حرا

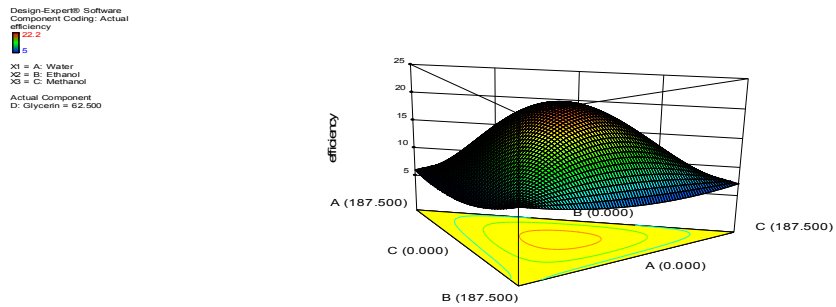
منبع	درجه آزادی	ضرایب	مجموع مربعات	اندیس p
Model	۱۰	۴۲۰/۰۷	۴۲/۰۱	۰/۰۰۰۲
Linear Mixture	۳	۱۸۷/۱۰	۶۲/۳۷	۰/۰۰۰۲
AB	۱	۶/۹۷	۶/۹۷	۰/۱۵۲۸
AC	۱	۲/۳۵	۲/۳۵	۰/۳۸۴۳
AD	۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۷۷۶۲
BC	۱	۲۸/۴۰	۲۸/۳۹	۰/۰۱۱۸
CD	۱	۱/۰۳	۱/۰۳	۰/۵۶۳۸
ABC	۱	۱۲۷/۶۱	۱۲۷/۶۱	<۰/۰۰۰۱
ACD	۱	۱۷/۶۲	۱۷/۶۲	۰/۰۳۵۲
residual	۹	۲۵/۸۵	۲/۸۷	
Lack of fit	۴	۱۹/۱۰	۴/۷۸	۰/۱۵۲
Pure error	۵	۶/۷۵	۱/۳۵	
Total	۱۹	۴۴۵/۹۳		
R ²	-	۰/۹۴		

جدول ۳- نتایج آزمون همبستگی پی‌رسون بر میزان قطبیت و درجه استحصال

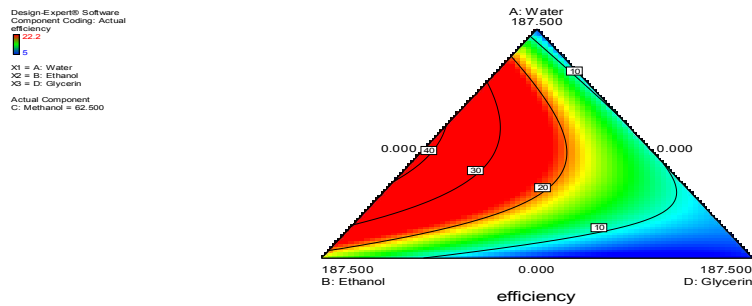
		استحصال قطبیت	
قطبیت	همبستگی پی‌رسون	۱	-۰/۵۱۸
	میزان معنی‌داری		۰/۰۲۳
استحصال	همبستگی پی‌رسون	-۰/۵۱۸	۱
	میزان معنی‌داری		۰/۰۲۳



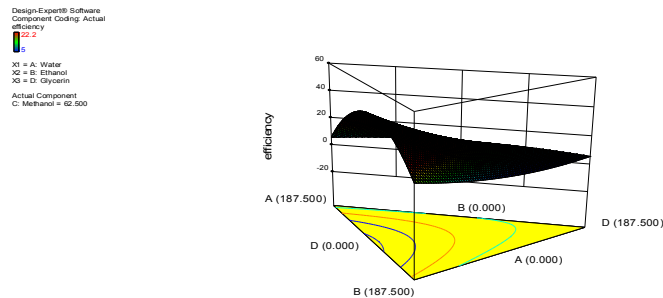
شکل ۱- تراز تاثیر نسبت‌های متفاوت آب، اتانول و متانول در میزان ثابت گلیسرین (۶۲/۵ میلی لیتر).



شکل ۲- سطح پاسخ برای نسبت‌های متفاوت آب، اتانول و متانول در میزان ثابت گلیسرین (۶۲/۵ میلی لیتر).



شکل ۳- تراز تاثیر نسبت‌های متفاوت گلیسرین، اتانول و آب در میزان ثابت متانول (۶۲/۵ میلی لیتر).



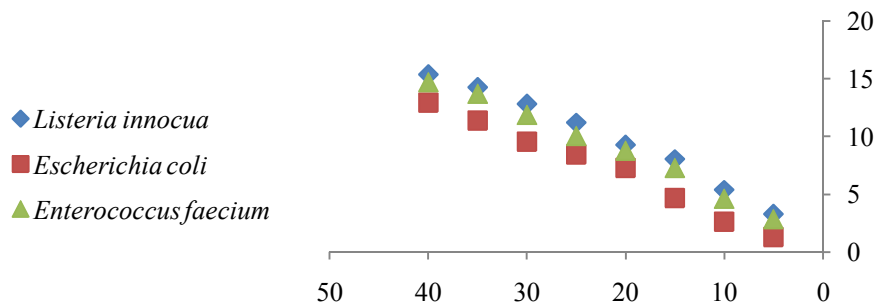
شکل ۴- سطح پاسخ تاثیر نسبت‌های متفاوت گلیسرین، اتانول و آب در میزان ثابت متانول (۶۲/۵ میلی لیتر).

علت این امر را می‌توان اختلاف ساختمانی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ذکر نمود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳) اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ *اکالیپتوس کامالدولانس* بر میکروارگانیسم‌های *E. coli*، *S. aureus* و *P. digitatum* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت در برابر عصاره‌های برگ *اکالیپتوس کامالدولانس* مربوط به باکتری گرم منفی *E. coli* بود. این محققان مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیرقابل نفوذ نسبت دادند.

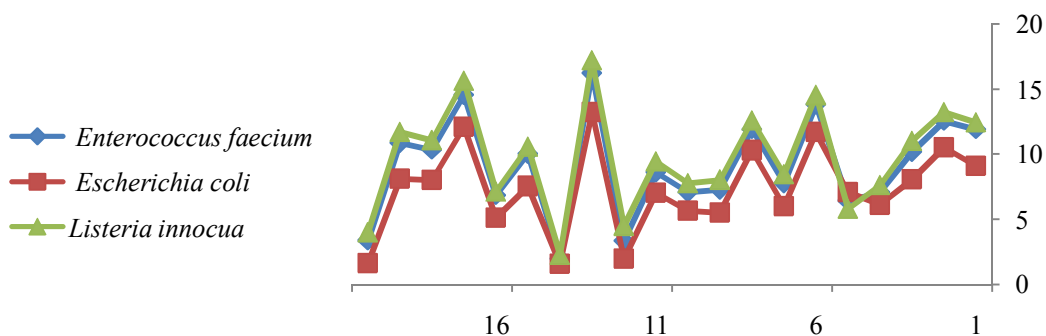
در این پژوهش برای انتخاب مناسب‌ترین نسبت حلال‌ها از روش بهبه‌سازی عددی با استفاده از نرم افزار (Design Expert) استفاده شد. هدف از بهبه‌سازی، افزایش بازدهی عصاره برگ گیاه حرا و کاهش قطبیت حلال بوده است. میزان تابع مطلوبیت ۰/۹۴ محاسبه شد که نشانگر صحت عملیات بهبه‌سازی می‌باشد. بر این اساس فرمولاسیون بهینه دارای گلیسرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول (۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود. با توجه به شکل ۷ و ۸ می‌توان چنین نتیجه گرفت که با نزدیک شدن به مرکز هندسه مخلوط، فضای از نسبت‌های مختلف سه حلال متانول، آب، و اتانول با شرط کمینه بودن قطبیت، ایجاد خواهد شد که میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا را به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از فرمولاسیون بهینه حلال بیانگر افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا نسبت به بالاترین بازدهی مشاهده شده در تیمار ۱۳ (جدول ۱) بود. جهت حصول اطمینان از اثر ضد میکروبی عصاره حاصل از فرمولاسیون بهینه از سه روش (انتشار در آگار به کمک دیسک، حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی) استفاده گردید. نتایج حاصل از انتشار در آگار به کمک دیسک در غلظت ۴۰ میلی‌گرم برلیتر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) افزایش هاله بازدارندگی بر سه میکروارگانیسم مورد آزمایش بود، همچنین نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی در جداول (۷ و ۸) آورده شده است.

بر اساس نتایج بدست آمده از تیمار حلال‌های مختلف، بیشترین اثر بازدارندگی بر میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش مربوط به تیمار سیزده (جدول ۱) می‌باشد. علت این امر را می‌توان درصد استحصال بیشتر عصاره برگ گیاه حرا و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر در توسط تیمار سیزده ذکر نمود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳)، اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا را بر دو گونه قارچ بیماری‌زا مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی برگ گیاه حرا نسبت به عصاره آبی دارای اثر بازدارندگی و کشندگی بیشتری بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه داشت، این محققان علت این امر را استخراج بیشتر عصاره برگ گیاه حرا توسط حلال اتانول ذکر کردند.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثر ضد میکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا به روش انتشار در آگار (به کمک دیسک) در جدول‌های ۴، ۵ و ۶ آورده شده است. این نتایج موید این مطلب می‌باشد که تیمارهای نوع حلال، غلظت عصاره و همچنین برهمکنش آن‌ها به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) موجب تغییر قطر هاله بازدارندگی عدم رشد (شاخص اثر ضد میکروبی عصاره) در سه باکتری مورد آزمایش می‌شود. از نظر تئوری قطر هاله عدم رشد عکس‌العملی از غلظت ماده موثر موجود در عصاره برگ گیاه حرا می‌باشد. در این پژوهش اثر ضد میکروبی عصاره‌های بدست آمده از تیمارهای مختلف (جدول ۱) در هشت سطح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر باکتری‌های *E. coli*، *E. faecium*، *L. innocua* مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). با توجه به نتایج می‌توان چنین بیان نمود که با افزایش غلظت عصاره میزان قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش پیدا کرده است، که این نتیجه موید تئوری ذکر شده در قسمت قبل می‌باشد. به‌طور کلی اثر ضد میکروبی هر عصاره بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود بطوری که باکترهای گرم مثبت *E. faecium* و *L. innocua* در مقایسه با باکتری گرم منفی *E. coli* حساسیت بیشتری داشتند (شکل ۶) و در غلظت کمتری از عصاره برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی ایجاد کردند.



شکل ۵- اثر غلظت عصاره برگ گیاه حرا به روی میزان قطر هاله عدم رشد در سه باکتری *Listeria innocua*، *Enterococcus faecium* و *Escherichia coli*.



شکل ۶- اثر تیمارهای مختلف حلال به روی میزان قطر هاله عدم رشد در سه باکتری *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli*

جدول ۴- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Listeria innocua*

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	اندیس p ^c
C ₁ ^a	۱۸	۶۸۲۲/۵۱	۳۷۹/۰۳	./۰۰۰
C ₂ ^b	۷	۷۳۷۲/۰۸	۱۰۳۸/۸۷	./۰۰۰
C ₁ C ₂	۱۲۶	۸۱۹/۷۶	۶/۵۱	./۰۰۰
Error	۳۰۴	۹۵/۶۷		
Total	۴۴۵	۱۵۰۱۰/۳۲		

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c- سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵)

جدول ۵- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Enterococcus faecium*

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	اندیس p ^c
C ₁ ^a	۱۸	۶۵۵۰/۹۲	۳۶۳/۹۴	./۰۰۰
C ₂ ^b	۷	۷۰۲۷/۴۷	۱۰۰۳/۹۲	./۰۰۰
C ₁ C ₂	۱۲۶	۸۵۱/۲۷	۶/۷۶	./۰۰۰
Error	۳۰۴	۲۰۲/۶۵	۰/۶۷	
Total	۴۴۵	۱۴۶۳۲/۳۱		

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c- سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵)

جدول ۶- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Escherichia coli*

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	اندیس p ^c
C ₁ ^a	۱۸	۵۳۳۰/۸۹	۲۹۶/۱۶	./۰۰۰
C ₂ ^b	۷	۶۸۱۹/۹۹	۹۷۳/۸۶	./۰۰۰
C ₁ C ₂	۱۲۶	۱۳۰۱/۳۳	۹/۵۳	./۰۰۰
Error	۳۰۴	۲۹۲/۰۳	۰/۹۶	
Total	۴۴۵	۱۳۶۴۱/۲۴		

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c- سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵)

جدول ۷- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره بهینه برگ گیاه حرا بر *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
بهینه	<i>Listeria innocua</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
بهینه	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
بهینه	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-

+: عدم رشد -: رشد

جدول ۸- نتایج حداقل غلظت کشندگی رشد (MBC) عصاره بهینه برگ گیاه حرا بر *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
بهینه	<i>Listeria innocua</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
بهینه	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-
بهینه	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-

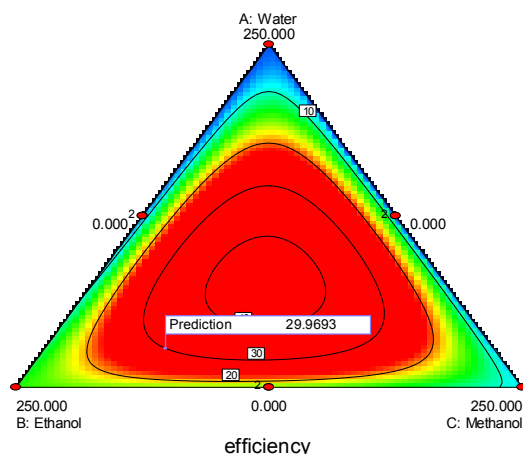
+: عدم رشد -: رشد

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره برگ گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر سویه‌های مورد مطالعه داشت. در ادامه لازم است تحقیقات وسیع‌تر و دامنه‌داری در شرایط "in vivo" انجام شود تا دوز مناسب این عصاره مشخص گشته و در نهایت اقدام ارزنده‌ای جهت بهبود بیمارهای عفونی ناشی از سوش‌های مختلف میکروبی انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

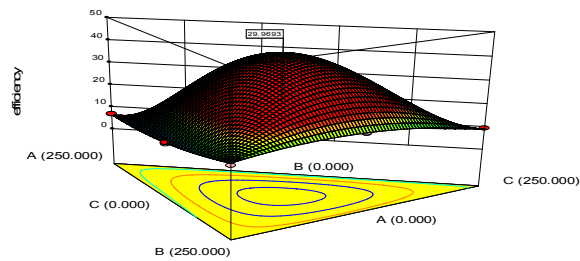
نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که چند جمله‌ای شف و روش بهینه‌سازی عددی با استفاده از روش مخلوط، به ترتیب برای برازش داده‌های حاصل از بازدهی استخراج عصاره برگ گیاه حرا و بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال مناسب می‌باشد. بر این اساس فرمولاسیون بهینه دارای گلیسرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول (۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود.

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
efficiency
● Design Points
22.2
5
X1 = A: Water
X2 = B: Ethanol
X3 = C: Methanol
Actual Component
D: Glycerin = 0.000



شکل ۷- تراز ترکیب حلال‌های مختلف برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا در شرایط بهینه

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
efficiency
● Design points above predicted value
● Design points below predicted value
22.2
0
X1 = A: Water
X2 = B: Ethanol
X3 = C: Methanol
Actual Component
D: Glycerin = 0.000



شکل ۸- سطح پاسخ ترکیب حلال‌های مختلف برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا در شرایط بهینه

قدردانی

و مریم حیدری سورشجانی که در جمع آوری نمونه‌ها و انجام آزمایش‌ها ما را یاری نمودند قدردانی می‌شود.

بدین وسیله از خانم مهندس نجمه خادمی پور، آزاده ظهوری

منابع

- علیزاده بهبهانی، ب. ۱۳۹۲. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) در شرایط "in vitro" و پرتقال روکش شده با کربوکسی متیل سلولز در شرایط "in situ" پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
- Ali, B., & Bashir, A., 1998, Toxicological studies on the leaves of *Avicennia marina* (mangrove) in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 18(2), 111-116.
- Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M., 2013, Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus "in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.
- Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M. M., & Vasiee, A., 2013, Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. *Journal of Paramedical Sciences*, 4(3), 89-99.
- Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mohebbi, M., 2012, Antimicrobial activity of *Avicennia marina* extracts ethanolic, methanol & glycerin against *Penicillium digitatum* (citrus green mold). *Scientific Journal of Microbiology*, 1(7), 147-151.
- Babayi, H., Kolo, I., Okogun, J., & Ijah, U., 2004, The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri*, 16(2), 106-111.
- Banada, P. P., Guo, S., Bayraktar, B., Bae, E., Rajwa, B., Robinson, J. P., Bhunia, A. K., 2007, Optical forward-scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1664-1671.
- Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., Kim, J. F., 2009, Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, 461(7268), 1243-1247.
- Benger, S., Townsend, P., Ashford, R. L., & Lambert, P., 2004, An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *The Foot*, 14(2), 86-91.
- Dorman, H., & Deans, S., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M., & Walsh, T., 2002, Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *Journal of clinical microbiology*, 40(9), 3204-3208.
- Garcia, E., & Totosaus, A., 2008, Low-fat sodium-reduced sausages: Effect of the interaction between locust bean gum, potato starch and κ -carrageenan by a mixture design approach. *Meat science*, 78(4), 406-413.
- Gonzales, R. D., Schreckenberger, P. C., Graham, M. B., Kelkar, S., DenBesten, K., & Quinn, J. P., 2001, Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *The Lancet*, 357(9263), 1179-1184.

- Heidari Sureshjani, M., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B., 2013, Antimicrobial effect of Satureja bachtiarica extracts aqueous, ethanol, methanol and glycerin on Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(2), 53-60.
- Holt, S. D., Resurreccion, A., & McWatters, K., 2006, Formulation, Evaluation and Optimization of Tortillas Containing Wheat, Cowpea and Peanut Flours Using Mixture Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 121-127.
- Kathiresan, K., & Bingham, B. L., 2001, Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in marine biology*, 40, 81-251.
- Lop, S., Silva, R., & Beleia, A., 1999, Formulation and evaluation of dry dessert mix containing sweetener combinations using mixture response methodology. *Food chemistry*, 66(2), 167-171.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M., 2006, Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International journal of food microbiology*, 107(2), 180-185.
- Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H., & Sedaghat, N., 2012, Coffee silverskin as a source of dietary fiber in breadmaking: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*. 50(2), 599-606.
- Razavi, M. A., Mortazavi, A., & Mousavi, M., 2003, Dynamic modelling of milk ultrafiltration by artificial neural network. *Journal of Membrane Science*, 220(1), 47-58.
- Ruguo, Hu., 1999, Food product design: a computer-aided statistical approach: CRC Press. 35-174.
- Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B., 2013, Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Teucrium polium L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences (JPS)*, 4(4), 55- 61.
- Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Koocheki, A., Afsharian, S., & Alizadeh Behbahani, B., 2013, Antimicrobial properties of plant extracts of Thymus vulgaris L., Ziziphora tenuior L. and Mentha Spicata L., against important foodborne pathogens in vitro. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(2), 23-30.
- Valero, M., & Salmeron, M., 2003, Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. *International journal of food microbiology*, 85(1), 73-81.
- Xie, L., Hall, D., Eiteman, M., & Altman, E., 2003, Optimization of recombinant aminolevulinate synthase production in Escherichia coli using factorial design. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 267-273.
- Zhou, J. z., Liu, X. L., Huang, K. h., Dong, M. s., & Jiang, H. h., 2007, Application of the mixture design to design the formulation of pure cultures in Tibetan kefir. *Agricultural Sciences in China*, 6(11), 1383-1389.
- Zhu, F., Chen, X., Yuan, Y., Huang, M., Sun, H., & Xiang, W., 2009, The chemical investigations of the mangrove plant Avicennia marina and its endophytes. *Open Natural Products Journal*, 2, 24-32.

Optimization of mangrove leaf extraction by mixture design and investigation of its antimicrobial effect on *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium* and *Escherichia coli*

B. Alizadeh Behbahani¹, A. Alghooneh¹, F. Tabatabaei Yazdi^{*2}, F. Shahidi², M. Mohebbi²

Received: 2013.11.16

Accepted: 2014.02.25

Introduction: *Avicennia marina*, commonly known as gray or white mangrove, is a specie of mangrove tree classified in the plant family *Acanthaceae*. It is distributed along Africa's east coast, south-west, south and south-east Asia, and southern Iran along the Persian Gulf coast. It grows as a shrub or tree to a height of three to ten meters. Mixture design is one of the most popular smart systems which is based on simulation of linear and non-linear systems using mathematical and statistical techniques, and a useful tool for dealing with completely unknown systems. Chemical preservatives are commonly used for inhibition of pathogens in foods, people are concerned about the side effects of preservatives on their health. Replacement of chemical preservatives with natural substances have a great importance in food preservation. Natural preservatives, as well as, essential oils and plant extracts are suitable alternatives for chemical preservatives. The main purposes of this study are the evaluation of the effects of different combinations of four solvents (water, ethanol, methanol and glycerin) on the efficiency of mangrove leaf extraction using response surface method with mixture optimal design, the optimization of solvent formulation for mangrove leaf extraction, and, finally, the evaluation of the in vitro inhibitory and bactericidal effects of mangrove leaf extract on *Listeria innocua* ATTC33090, *Enterococcus faecium* ATTC 51559 and *Escherichia coli* ATTC 25992.

Materials and method: Fresh mangrove leaves were prepared from Qeshm Island, Persian Gulf, Iran, in August 2012. Water, ethanol, methanol and glycerin extracts were prepared by adding 50 g of powdered mangrove leaf to 250 mL of the solvent. Extraction was carried out for 48h, in ambient temperature. The mixture of extract and leaf powder was separated by Watman filter paper, then the filtrate was centrifuged in 3000g for 10 minutes and filtered using a 0.45 μm Millipore filter. Finally, in order to separate the solvent and concentrated extract, the solutions were evaporated using a rotary vacuum evaporator. The concentrated extract was stored in dark aluminum containers at 4°C. In this study, the effects of water, ethanol, methanol and glycerin at five levels (0, 31.25, 83.33, 125 and 250 ml) on efficiency of mangrove leaf extraction by mixture optimal design has been investigated. Modeling and optimization has been carried out by Scheffe polynomial. The antimicrobial activity of mangrove leaf extract was evaluated using disk diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of mangrove leaf extract was determined using serial dilution tubes. For each extraction method (based on solvent, Water, Ethanol, Methanol and Glycerin), 8 serial concentrations (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 mg/mL) and 1 control tube of mangrove leaf extract were prepared in Mueller-Hinton broth. The minimum bactericidal concentration (MBC) of mangrove leaf extract was determined using serial dilution tubes.

Results and Discussion: The Results indicated that Scheffe polynomial model was highly significant for prediction of efficiency of mangrove leaf extraction (R^2 and R^2_{adj} values equal to 0.940 and 0.8447, respectively and The lack-of-fit tests did not result in a significant, also F-value (14.62) indicated that the model is sufficiently accurate). The optimum formulation was found as following: glycerin (0 ml), water (28.22 ml), methanol (59.83ml) and ethanol (161.95 ml) respectively. Maximum of antimicrobial effect on *Listeria innocua* and highest resistance against mangrove leaf extract on *Escherichia coli* were observed. Increasing concentration of mangrove extracts had a significant effect ($p < .05$) on inhibition zone diameter. This may have been resulted from the increment of the solvent polarity associated with glycerin increase. In order to study the mentioned hypothesis, Pearson Square statistical test was used to determine the correlation between the extraction rate and

1- Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.

2- Professors, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.

(*-Corresponding Author Email: tabatabai@um.ac.ir)

polarity. The results showed that a significant ($P \leq 0.05$) and inverse relationship between the extraction rate and polarity of the solvent. Moreover, in order to check the accuracy of the model fitted on the data obtained from mangrove leaf extraction rate the goodness of fit was investigated using both coefficient of determination (R^2) and lack of fit test. A 94% coefficient of determination and lack of significance ($P \leq 0.05$) for lack of fit test suggested that Scheff model could accurately fit the data and predict it. The results of this study showed that Scheff polynomial and numerical optimization using mixture design method were suitable to fit efficiency of mangrove leaf extraction and solvent formulation optimization data, respectively. According to the results, the optimized solvent formulation was glycerin (0 mL), water (28.22 mL) and ethanol (161.95 mL).

Conclusion: Finally, the results showed that mangrove leaf extract had a notable antimicrobial effect on the studied strains "*in vitro*". More "*in vivo*" studies seem to be required in order to determine the best extract dosage which leads to inhibition of microbial infection.

Keywords: Mangrove Plant, Optimization, Mixture Design, Inhibition Zone Diameter.

بررسی ویژگی‌های بافتی میوه گلابی طی فرآیند خشک کردن در خشک کن قفسه‌ای

محمد مهدی حیدری فروشانی^۱، سید مهدی نصیری*^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۱

چکیده

در این تحقیق روند تغییرات ویژگی‌های بافتی گلابی در تیمارهای مختلف خشک شدن به صورت لایه نازک در یک خشک کن قفسه‌ای در تیمارهای مختلف دما و سرعت هوای خشک کن مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. آزمایش‌های خشک کردن در سه سطح دما (۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد) و سه سطح سرعت هوا (۰/۵، ۱ و ۱/۵ متر بر ثانیه) انجام گرفت و ویژگی‌های بافتی نمونه‌های گلابی در پنج سطح محتوای رطوبتی (۸۲، ۶۶، ۵۱، ۳۵ و ۲۰ درصد بر اساس وزن مرطوب) در شرایط مختلف خشک کردن اندازه‌گیری شد. در این پژوهش از یک سیستم داده برداری بر-خط برای جمع‌آوری اطلاعات استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که ویژگی‌های بافتی نمونه‌ها در طول فرایند خشک کردن تغییر کرده و این تغییرات مرتبط با شرایط خشک کردن است. با کاهش رطوبت محصول طی فرایند خشک شدن سختی بصورت خطی کاهش و قابلیت ارتجاعی و چسبندگی به صورت خطی افزایش یافت. قابلیت جویدن در دامنه رطوبت اندازه‌گیری شده روند سهمی شکل از خود نشان داد به نحوی که بیشترین مقدار آن در محدوده رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد مشاهده شد. تجزیه واریانس نشان داد تاثیر دما بر ویژگی‌های سختی، قابلیت ارتجاعی و قابلیت جویدن معنی‌دار ($P < 0/01$) بود در حالی که بر پیوستگی و چسبندگی معنی‌دار نبود. افزون بر آن، مشخص شد که اثر سرعت هوا بر تمام این ویژگی‌ها معنی‌دار است. از آنجا که بر اساس نتایج به دست آمده کمترین مقدار قابلیت جویدن (۰/۴۶ ژول) مربوط به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱ متر بر ثانیه بوده این تیمار بعنوان مطلوب‌ترین تیمار خشک کردن گلابی پیشنهاد می‌گردد. مدت زمان خشک شدن در این تیمار در حدود ۳۳/۵ ساعت بود که از کمترین زمان خشک شدن در شرایط ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۱/۵ متر بر ثانیه تقریباً ۲۴ ساعت طولانی‌تر و از بلندترین آن در شرایط خشک شدن ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۰/۵ متر بر ثانیه در حدود ۶/۵ ساعت کوتاه‌تر بود.

واژه‌های کلیدی: گلابی، خشک کردن، ویژگی‌های بافتی، خشک کن قفسه‌ای

مقدمه

دیگر نیازی به تجهیزات سردخانه‌ای برای حفظ آن‌ها نیست. همچنین خشک کردن میوه‌ها امکان تولید محصولات با طعم و بافت متنوع را افزایش می‌دهد. (Earle, 1988; Hayashi, 1989). خشک کردن یک فرایند پیچیده است که هنوز مکانیسم انجام آن بطور کامل درک نشده است. واکنش‌های شیمیایی و بیولوژیکی پیچیده‌ای در طول مدت فرایند خشک شدن صورت می‌پذیرد که این واکنش‌ها ویژگی‌های بافتی و ریزساختاری میوه‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از طرف دیگر کاهش رطوبت تا سطح معین باعث چروکیدگی حجمی^۳ میوه می‌شود (Guine et al., 2007a; Nassiri & Heydari, 2014). چروکیدگی بافت سلولی با کاهش فشار تورمی (ترژسانس) رابطه داشته و نتیجه این امر نیز ایجاد تغییرات در ویژگی‌های بافتی محصول است. ویژگی‌های بافتی نقش مهمی در کیفیت محصول خشک شده دارد و شاخصی مهم برای تعیین میزان بازار پسندی محصول است (Ferreira et al., 2008).

در میان میوه‌ها خشک کردن انگور، انجیر، آلو، زرد آلو و هلو

بطور کلی اکثر میوه‌ها به علت دارا بودن رطوبت بالا، حساس به فساد می‌باشند و پس از برداشت باید به مصرف تازه‌خوری برسند و یا اینکه به روش خاصی نگهداری شوند. یکی از این روش‌ها، خشک کردن می‌باشد. خشک کردن میوه‌ها و سبزی‌ها یکی از قدیمی‌ترین روش‌های حفظ آن‌ها بوده و هم اکنون نیز یک روش عملی برای افزایش ماندگاری آن‌ها است. هنگامی که مقدار رطوبت اضافی از میوه خارج شود زمان نگهداری آن از طریق مهار کردن رشد میکروبی و کاهش فعالیت آنزیمی افزایش می‌یابد (Moradi & Zomorodian, 2009). از دیگر مزایای خشک کردن میوه‌ها و سبزی‌ها کاهش اندازه‌ی آن بوده که این امر برای حمل و نقل و ذخیره‌سازی قابل اهمیت است. از سوی دیگر با خشک کردن میوه‌ها

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

* - نویسنده مسئول: (Email: mnasiri@shirazu.ac.ir)

نگهداری شدند. از این میوه‌ها نمونه‌های آزمایش به دست آمد. برای تهیه نمونه‌ی گلابی اهداف زیر مد نظر قرار گرفت:

الف) نمونه جدا شده از گلابی دارای بافت همگن (بدون پوست و دانه) باشد تا نتایج آزمون بافت حداقل پراکنش داده‌ها را داشته باشد.
ب) نمونه خشک شده به شکلی باشد که بتوان آن را به صورت مستقیم به بازار عرضه کرد.

ج) ابعاد نمونه خارج شده به گونه‌ای باشد که چروکیدگی حجمی نمونه پس از خشک شدن آنقدر نباشد که انجام آزمون بافت بر روی نمونه‌ها را غیرممکن سازد.

با توجه به موارد گفته شده و پس از انجام آزمون‌های اولیه، نمونه‌ها از قسمت بالای گلابی و با ابعاد $2 \times 2 \times 5/2$ سانتی‌متر تهیه شدند. این نمونه‌ها فاقد هسته و پوست بوده و برای کاهش اثر برش بر بافت نمونه‌های گلابی، نمونه‌ها با استفاده از تیغه‌های جراحی از میوه جدا شدند. بمنظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنزیمی، نمونه‌ها پس از جداسازی از میوه به مدت یک دقیقه در محلول ۱ درصد سدیم متابی سولفیت ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) قرار داده شدند. سپس قبل از قرار گرفتن نمونه‌ها در خشک‌کن، محلول از سطح آن‌ها به وسیله‌ی فیلتر کاغذی جدا شد (Khin *et al.*, 2007)

خشک کردن و اندازه‌گیری محتوای رطوبتی نمونه

برای بررسی اثر هوای خشک‌کن بر محصول سه دما و سه سرعت هوا برای خشک کردن گلابی در خشک‌کن قفسه‌ای انتخاب شد. دماهای هوای خشک‌کن ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد (Guine *et al.*, 2007b). عملاً این محدوده دمایی امکان استفاده از خشک‌کن‌های تجاری مجهز به منبع حرارتی خورشیدی را نیز ممکن می‌سازد. سرعت هوای مورد استفاده برای خشک کردن نیز ۰/۵، ۱ و ۱/۵ متر بر ثانیه تنظیم گردید. این محدوده‌ی سرعت هوا در تحقیقات گذشته نیز استفاده و پیشنهاد شده بود (Akpınar *et al.*, 2003; Guine *et al.*, 2007a)

برای انجام آزمایش‌ها از یک خشک‌کن نوع قفسه‌ای آزمایشگاهی (شکل ۱) که در بخش مهندسی مکانیک ماشین‌های کشاورزی دانشگاه شیراز ساخته شد بود، استفاده شد (Zomorodian & Amanlou, 2010). تعداد ۶ قطعه آماده شده بر روی سینی توری شکل خشک‌کن قرار داده شد. این توری بصورت معلق در فضای خشک‌کن به زیر یک ترازوی دیجیتال (A&D مدل GF600 با دقت $\pm 0/001$ گرم) آویزان شد تا امکان توزین نمونه‌ها بدون خارج کردن آن‌ها از داخل خشک‌کن را میسر سازد. برای کنترل دمای هوای خشک‌کن از یک کنترل کننده دما (آتین سری SINUS، ساخت ایران) استفاده شد. حسگر این کنترل کننده از نوع ترموکوپل مدل PT100 با دقت $\pm 0/1$ درجه سانتی‌گراد بود. تغییر سرعت هوا

مرسوم و تجاری بوده و خشک کردن سیب، گلابی، موز و آناناس با توجه به سودآوری آن‌ها اخیراً بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Woods & Phoungchandang, 2000; Togrul & Pehlivan, 2002).

خشک کردن گلابی در ایران بصورت سنتی و با استفاده از انرژی خورشید انجام می‌شود. برای این کار ابتدا قسمت خراش خورده یا ضربه دیده (لکه دار شده) را از میوه جدا کرده سپس میوه را به اندازه‌های مناسب تقسیم کرده در معرض نور خورشید قرار می‌دهند تا مقداری از رطوبت خود را از دست بدهد و پس از آن میوه‌ها را تا رسیدن به رطوبت مطلوب و بافت مناسب در سایه خشک می‌کنند. این شیوه خشک کردن رو باز دارای مشکلات بهداشتی از قبیل، قرار گرفتن در معرض انواع حشرات، کرم‌ها، موش‌ها، پرنده‌گان و گرد و غبار می‌باشد (Moradi & Zomorodian, 2009). صرف نظر از مشکلات بهداشتی، این شیوه خشک کردن به میزان زیادی به شرایط آب و هوا وابسته است. با توجه به این موضوعات این روش خشک کردن لزوماً روش ارزان قیمتی در مقایسه با سایر روش‌های خشک کردن نیست چون قیمت محصول خشک شده تابع کیفیت حاصل شده نهایی است (Guine, 2006).

یکی از روش‌های تجاری خشک کردن میوه‌ها، عبور دادن هوای گرم از روی محصول در خشک‌کن‌های قفسه‌ای می‌باشد (Yagcioglu *et al.*, 1999). در این خشک‌کن‌ها شرایط هوای ورودی (دما و سرعت هوا) باید بگونه‌ای انتخاب شود که علاوه بر ارزش غذایی محصول، بافت مطلوب (مورد پسند مشتری) را در محصول حفظ نماید (Zomorodian & Amanlou, 2010).

با توجه به موارد ذکر شده، تحقیق حاضر با هدف بررسی روند تغییرات ویژگی‌های بافتی گلابی در حین فرایند خشک شدن تا رسیدن به رطوبت نهایی در یک خشک‌کن قفسه‌ای، در شرایط مختلف هوای ورودی از لحاظ دما و سرعت انجام شد. نتایج این تحقیق می‌تواند شرایط بهینه برای طراحی خشک‌کن‌های هوشمند (پارامتر متغیر) را مشخص نماید.

مواد و روش

آماده‌سازی نمونه‌های گلابی

میوه گلابی از رقم شاه میوه از یک باغ واقع در شهرستان خمینی شهر به صورت دست چین تهیه شد و پس از انتقال به دانشگاه شیراز تا زمان آزمایش در یخچال با دمای 4 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه بزرگ این رقم امکان تهیه نمونه‌های مکعبی با کیفیت تقریباً یکسان را فراهم می‌ساخت. میوه‌ها قبل از انجام آزمون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ژرمیناتور (مدل JTGL 100، ساخت شرکت ژال تجهیز) در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵ درصد

مورد استفاده برای انجام آزمون‌ها BONGSHIN مدل DBBP-50 با حداکثر ظرفیت ۵۰ کیلوگرم نیرو (ساخت کشور کره) بود. آزمون فشاری دو سیکیلی به اندازه ۵ میلی‌متر با یک پروب به قطر ۶ میلی‌متر از جنس آلومینیوم و صفحه زیرین آن به قطر ۷۵ میلی‌متر از جنس آلومینیوم صورت پذیرفت. مقدار ۵ میلی‌متر جابجایی پروب پس از تماس آن با سطح نمونه‌ها (شکل ۲) با سرعت ۱ میلی‌متر بر ثانیه صورت پذیرفت (Khin et al., 2007). ویژگی‌های بافت از روی نمودار نیرو-زمان بر اساس آنچه بورن^۳ (۲۰۰۲) بیان داشته، محاسبه و تعیین شد. این ویژگی‌ها عبارت بودند از:

الف) سختی: حداکثر نیروی اعمال شده طی مرحله نخست فشردن را نشان می‌دهد و این شاخص به صفات نرمی یا سفتی ماده‌ی غذایی مربوط است

ب) چسبندگی: کار لازم برای جدا کردن صفحه‌ی فشار دهنده‌ی دستگاه از ماده‌ی غذایی را نشان می‌دهد و به صفات حسی چسبی و لعابی بودن ماده‌ی غذایی مربوط است

ج) قابلیت ارتجاعی: طول سیکل فشاری در طی مرحله دوم فشردن را نشان می‌دهد و معرف مقدار ارتفاعی است که در مدت زمان بین انتهای مرحله اول فشردن و شروع مرحله دوم فشردن در محصول بازیابی می‌شود. این شاخص به صفات پلاستیک و الاستیک بودن جسم مربوط می‌شود

د) پیوستگی: نسبت کار انجام یافته طی مرحله دوم به کار انجام یافته در مرحله اول فشردن است

ه) قابلیت جویدن: حاصل ضرب سه ویژگی سختی، پیوستگی و قابلیت ارتجاع بوده و انرژی لازم برای هضم دهانی و جویدن مواد غذایی جامد را نشان می‌دهد.



شکل ۲- پروب و صفحه‌ی زیر نمونه در آزمایش بافت

تعیین روند تغییرات ویژگی‌های بافت در حین خشک شدن

برای اندازه‌گیری ویژگی‌های بافت گلابی در حین فرایند خشک شدن، خصوصیات نام برده شده قبلی در پنج سطح محتوای رطوبتی (۸۲، ۶۶، ۵۱، ۳۵ و ۲۰ درصد بر اساس وزن مرطوب) در

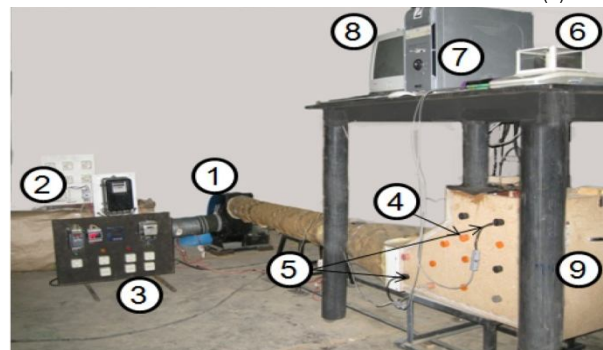
نیز با تغییر گردش دمنده با استفاده از دستگاه الکتریکی کنترل دور یا اینورتور (هیوندای مدل N50، ساخت کشور کره) صورت گرفت. در طی خشک شدن وزن نمونه‌ها از طریق اتصال مستقیم ترازوی دیجیتال به رایانه در هر ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری و ثبت شد. در هر بار قرائت وزن که به مدت ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامید، حدود ۱۵ داده وزن ثبت گردید. وزن خشک نمونه‌ها با قرار دادن آن‌ها در داخل آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد و در نهایت رطوبت نمونه‌ها مطابق با روش گوین^۱ و همکاران (۲۰۰۷b) اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که منحنی رطوبتی (سینتیک خشک شدن) تغییرات نسبت رطوبت به زمان را بیان می‌کند. نسبت رطوبت که مشخص کننده فرآیند خشک کردن است با توجه به رطوبت اولیه، رطوبت تعادلی و رطوبت نمونه در هر لحظه در طی خشک شدن با رابطه (۱) محاسبه گردید.

$$MR = \frac{M_d - M_e}{M_0 - M_e} \quad (1)$$

که MR نسبت رطوبت، M_d رطوبت نمونه در لحظه حاضر بر پایه خشک، M_e رطوبت تعادلی و M_0 رطوبت اولیه نمونه است.

براساس تحقیقات انجام شده برای محصولات با رطوبت زیاد معادله (۱) به صورت معادله (۲) ساده می‌گردد (Wang & Singh, 1978). در نتیجه برای محاسبه نسبت رطوبت نیازی به اندازه‌گیری رطوبت تعادلی نیست.

$$MR = \frac{M_d}{M_0} \quad (2)$$

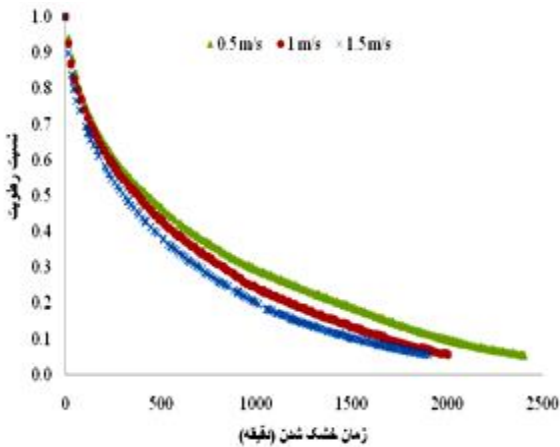


شکل ۱- سامانه خشک‌کن: اجزای این خشک‌کن شامل

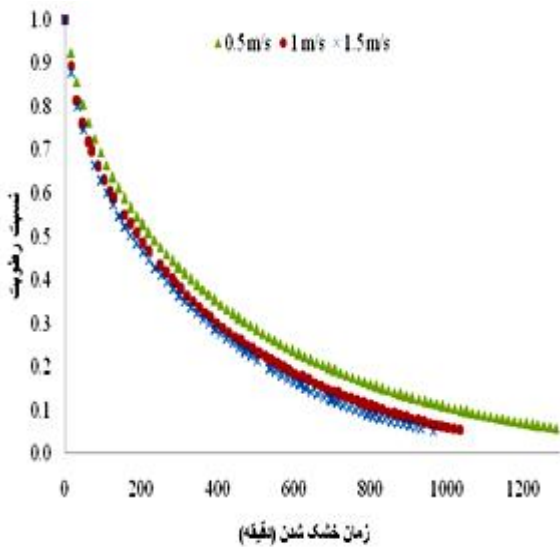
- ۱- دمنده
- ۲- تونل گرم‌کن هوا
- ۳- سیستم کنترل سرعت و دمای خشک‌کن
- ۴- اتاقک خشک‌کن
- ۵- سنسورهای اندازه‌گیری دما و رطوبت نسبی در دهانه ورودی و خروجی
- ۶- ترازو
- ۷- دیتالاگر
- ۸- کامپیوتر
- ۹- در خشک‌کن.

تحلیل پروفیل بافت (TPA^۲) نمونه‌ها

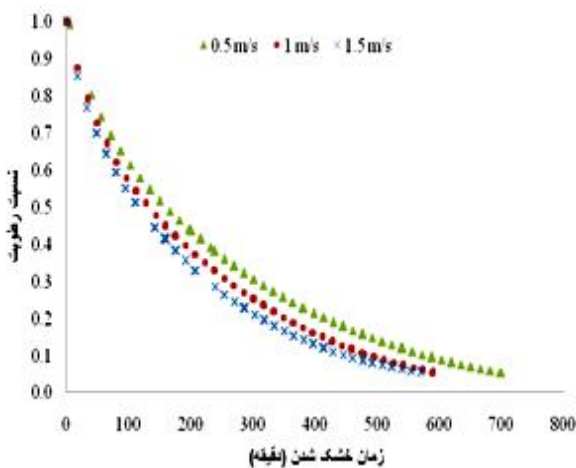
آزمون بافت و اندازه‌گیری ویژگی‌های بافتی با استفاده از دستگاه اینستران (مدل STM 20، ساخت شرکت سنتام) انجام شد. نیروسنج



شکل ۳- تغییرات نسبت رطوبت به زمان در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت‌های مختلف.



شکل ۴- تغییرات نسبت رطوبت به زمان در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت‌های مختلف.



شکل ۵- تغییرات نسبت رطوبت به زمان در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت‌های مختلف.

تیمارهای مختلف خشک کردن با پنج نمونه مورد آزمایش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

اثرات دما و سرعت هوا طی فرایند خشک شدن گلابی در رطوبت‌های مختلف بر ویژگی‌های بافتی میوه گلابی بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در نرم‌افزار SPSS (16) مورد بررسی قرار گرفت و میانگین بین تیمارهای مختلف با آزمون دانکن در سطح یک درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

بررسی روند خشک شدن گلابی

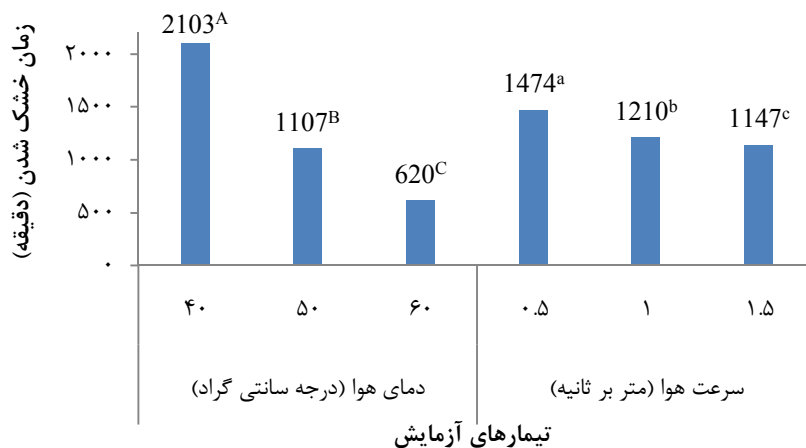
میزان محتوای رطوبتی اولیه نمونه‌ها به صورت میانگینی از ۳۰ نمونه تصادفی برابر با 82 ± 1 درصد بر اساس وزن مرطوب اندازه‌گیری شد. خشک شدن تا زمان رسیدن محتوای رطوبت نمونه‌ها به ۲۰ درصد بر پایه وزن مرطوب ادامه داشت. این میزان با توجه به تحقیق انجام شده توسط گوین (۲۰۰۶) انتخاب شد. این محقق نشان داد که فعالیت آبی در این محتوای رطوبتی در حدی است که فعالیت آنزیمی و میکروبی گلابی را کاهش داده و گلابی خشک شده کیفیت خود را از دست نمی‌دهد. تغییرات نسبت رطوبتی نمونه‌های گلابی طی شرایط مختلف خشک‌کن کابینتی در شکل‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ نشان داده شده است. در این نمودارها رطوبت محصول با نرخ نزولی نسبت به زمان خشک شدن تغییر می‌کند. افزایش دما باعث کاهش رطوبت نسبی هوای خشک‌کردن و در نتیجه افزایش پتانسیل جذب رطوبت هوای خشک‌کن می‌گردد که این امر کاهش زمان خشک کردن را در پی خواهد داشت. افزایش سرعت هوای خشک‌کن نیز به دلیل افزایش حجم کل هوای خشک کردن مورد استفاده با پتانسیل جذب رطوبت بالا، باعث کاهش زمان خشک کردن می‌شود (Heydari & Nassiri, 2015).

مقایسه میانگین اثرات دما و سرعت هوا بر روی مدت زمان خشک شدن با آزمون توکی در شکل ۶ نشان می‌دهد هر سه سطح دما و سرعت هوا در سطح ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. این نمودار نشان می‌دهد که تغییر دما تأثیر بیشتری در اختلاف بین مدت زمان خشک شدن تیمارها گذاشته است. همچنین مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف خشک شدن با آزمون توکی در شکل ۷ نشان داده شده است. بر اساس شکل تمام تیمارها به جز دو تیمار سرعت ۱ و ۱/۵ متر بر ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری (سطح ۱٪) در مدت زمان خشک شدن دارند.

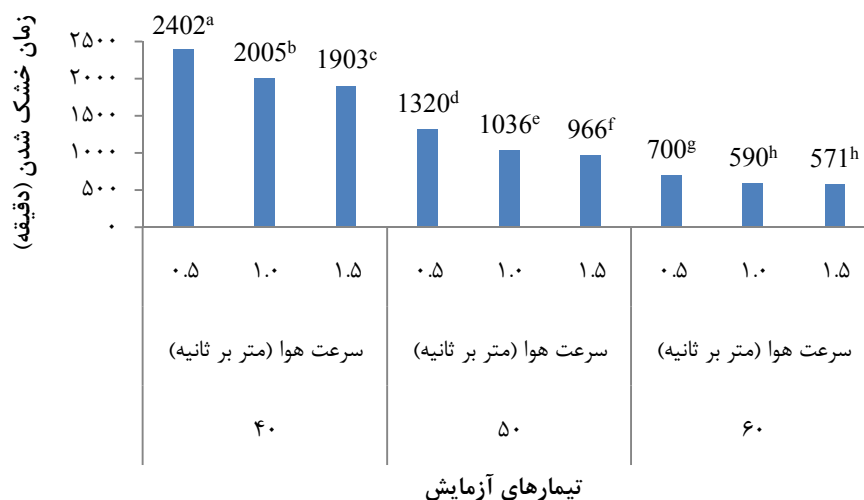
روند تغییرات ویژگی‌های بافتی

چسبندگی، قابلیت ارتجاعی، پیوستگی و قابلیت جویدن به ترتیب ۳۳۶، ۱۸۳، ۱۸۳، ۲۴۱ و ۱۹ بدست آمد که در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ویژگی‌های بافتی نشان داد که در سطوح مختلف محتوای رطوبتی خصوصیات معنی‌داری در نمونه‌های در حال خشک شدن پدید آمده است. مقدار F برای سختی،



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر عامل‌های اصلی دما و سرعت هوا بر مدت زمان خشک شدن (حروف لاتین متفاوت در هر عامل اصلی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد)



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر شرایط هوای خشک‌کن کابینتی بر مدت زمان خشک شدن

(حروف لاتین متفاوت در هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشند)

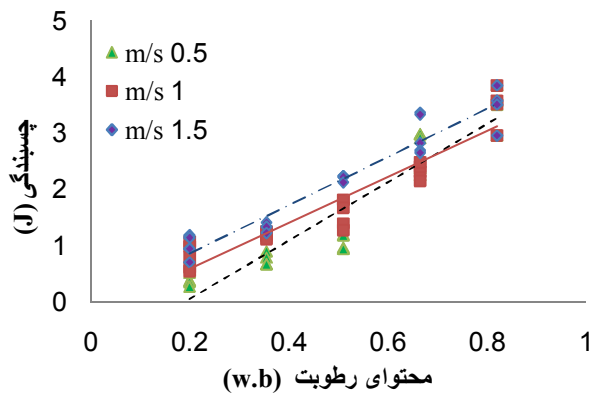
سختی

روند تغییرات سختی در شرایط مختلف خشک شدن در شکل‌های ۸ و ۹ نشان می‌دهد که با کاهش محتوای رطوبت، سختی نمونه‌های گلایی بصورت نمایی کاهش پیدا کرده است. سختی نمونه‌های اولیه قبل از خشک کردن به علت بالا بودن فشار تورمی سلول‌ها بوده و به

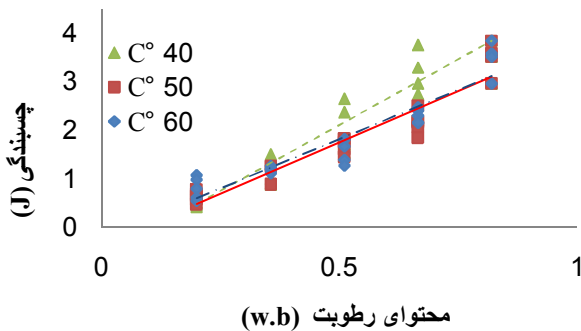
بر اساس نتایج بدست آمده از تیمار حلال‌های مختلف، بیشترین اثر بازدارندگی بر میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش مربوط به تیمار سبزه (جدول ۱) می‌باشد. علت این امر را می‌توان درصد استحصال بیشتر عصاره برگ گیاه حرا و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر در توسط تیمار سبزه ذکر نمود.

چسبندگی

روند تغییرات چسبندگی با تغییرات محتوای رطوبتی نمونه‌ها در شکل‌های ۱۰ و ۱۱، نشان داده شده است. همان طور که مشخص است با کاهش محتوای رطوبتی، میزان چسبندگی بصورت خطی کاهش پیدا کرده است. این بدان معنی است که کار لازم برای غلبه بر نیروی کشش بین سطح پروب و نمونه‌ها با کاهش رطوبت کم می‌شود. دلیل این امر را می‌توان در کاهش چسبندگی سطحی دانست زیرا چسبندگی به میزان قابل توجهی به رطوبت سطحی نمونه وابسته است (Adhikari et al., 2001) که با خشک شدن لایه‌های سطحی گلابی طی خشک شدن از این میزان کاسته می‌شود.



شکل ۱۰- تغییرات میزان چسبندگی نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد



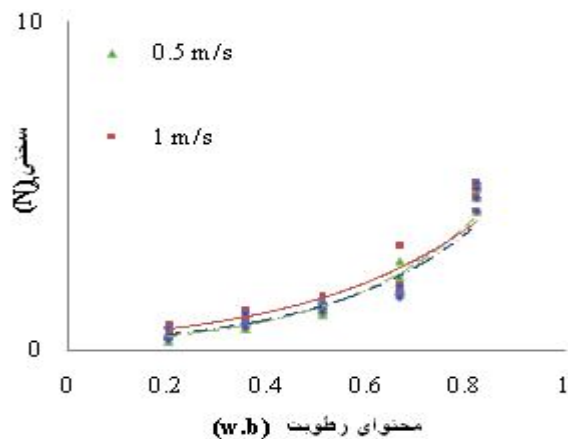
شکل ۱۱- تغییرات چسبندگی نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در سرعت ۱ متر بر ثانیه

روند کاهش چسبندگی با کاهش رطوبت در دماهای مختلف به طوری است که چسبندگی نهایی آن‌ها تفاوتی نسبت به هم نشان نمی‌دهند (تاثیر دمای هوای خشک کردن بر ویژگی چسبندگی معنی دار نشده است (جدول ۲)).

قابلیت ارتجاعی

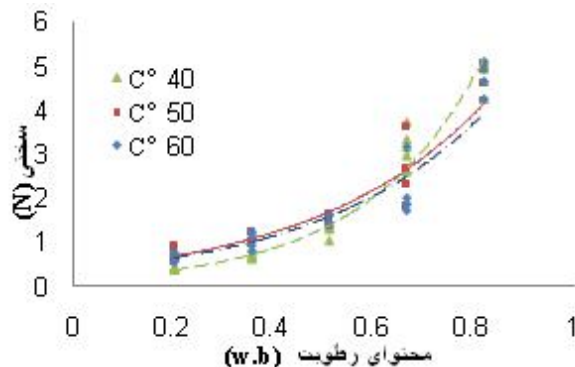
روند تغییرات قابلیت ارتجاعی در شرایط مختلف خشک شدن در

تدریج که این رطوبت از سلول‌ها خارج گردیده از مقاومت آن کاسته شده است (Ferreira, et al. 2008). علاوه بر آن چسبندگی و پیوستگی سلول‌ها به علت کاهش آب میان سلولی نیز کاهش یافته است که این موضوع نیز باعث کاهش مقاومت بافت محصول در مقابل نیروی خارجی می‌شود (Ferreira, et al. 2008). نزدیک شدن محتوای رطوبتی در لایه‌های بیرونی و درونی نمونه‌ها به یکدیگر طی خشک شدن و به عبارتی کاهش شیب (گرادیان) رطوبتی در درون محصول، کاهش سختی در طول خشک شدن را باعث می‌شود (Janjai et al., 2008a).



شکل ۸- تغییرات ویژگی سختی نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد

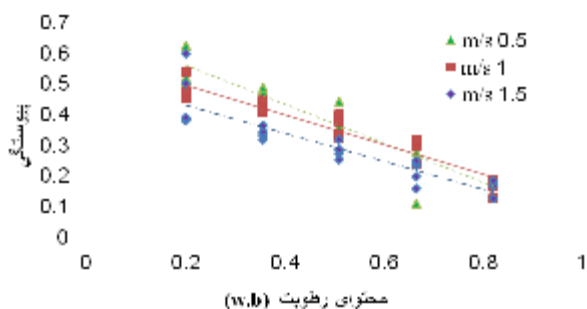
علاوه بر این، نتایج نشان داد که نمونه‌های خشک شده با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد سختی کمتری نسبت به دو دمای دیگر داشتند (در جدول ۳ نشان داده شده که سختی نمونه‌های خشک شده با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد دارای تفاوت معنی‌دار با دو دمای دیگر است). دلیل این امر را می‌توان ناشی از خشک شدن یکنواخت‌تر نمونه‌ها از سطح نمونه تا مرکز (شیب رطوبتی کمتر) با توجه به شیب دمای کمتر (Janjai et al., 2008b) و مدت زمان بیشتر قرار گرفتن نمونه‌ها در خشک‌کن برای رسیدن به یک رطوبت یکسان دانست.



شکل ۹- تغییرات ویژگی سختی نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در سرعت ۱ متر بر ثانیه

پیوستگی

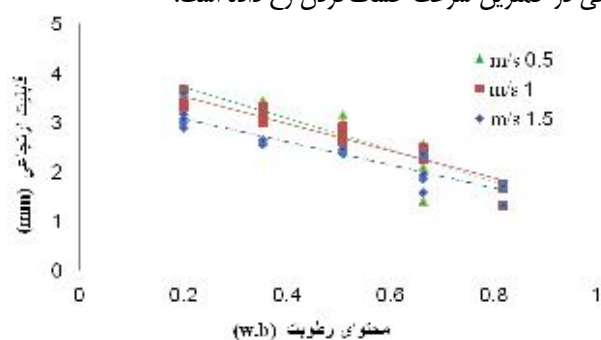
تغییر ویژگی پیوستگی با تغییر محتوای رطوبتی نمونه‌ها در شکل‌های ۱۴ و ۱۵ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل‌ها مشخص گردیده است با کاهش محتوای رطوبت پیوستگی به صورت خطی افزایش می‌یابد. همچنین در شکل ۱۴، مشخص است که منحنی‌ها در دمای ثابت و سرعت‌های مختلف شکلی واگرا نسبت به هم دارا هستند که این امر یکنواختی نمونه‌های اولیه از لحاظ بافتی و تاثیر تیمار خشک کردن در پراکنش این ویژگی‌های را نشان می‌دهد. پیوستگی کار انجام شده در سیکل فشاری دوم نسبت به کار انجام شده به سیکل فشاری اول است. به عبارتی میزان انرژی صرف شده طی فشار دوم دندان‌ها به نمونه به این میزان در فشار اول می‌باشد. بنابراین برای بررسی تغییر پیوستگی نیاز به بررسی تغییر سطح زیر نمودار در سیکل فشار اول و دوم می‌باشد. به همین منظور برای نمونه، تغییر این سطوح برای دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در شکل‌های ۱۶ و ۱۷، نشان داده شده است. همانطور که مشخص است با کاهش محتوای رطوبت میزان سطح زیر نمودار (کار انجام شده) در سیکل اول و سیکل فشاری دوم کاهش پیدا کرده است ولی نرخ کاهش مربوط به سطح زیر منحنی در سیکل اول بیشتر از سطح دوم است که این امر در نهایت افزایش پیوستگی را به همراه دارد. مقادیر شیب این منحنی‌ها در محتوای رطوبتی مختلف در جدول ۱، نشان داده شده است.



شکل ۱۴- تغییرات ویژگی پیوستگی نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد

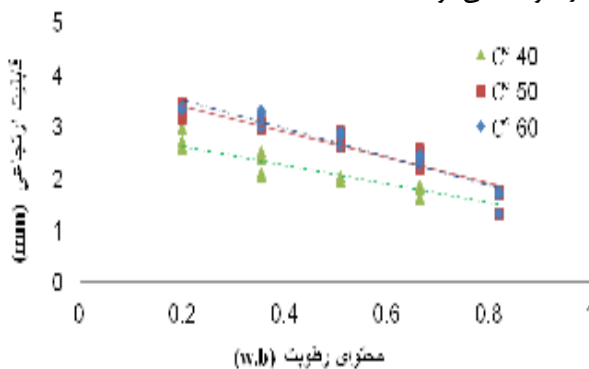
نمودار تغییر پیوستگی در دماهای مختلف و سرعت ۱ متر بر ثانیه در شکل ۱۵، نمایش داده شده است. نمودارهای دمای ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد دارای شیب یکسان است بطوری که پیوستگی در رطوبت‌های یکسان تفاوت معنی‌داری نسبت بهم نشان نمی‌دهند (در جدول ۳ نشان داده شده که دما دارای اثر معنی‌دار بر ویژگی پیوستگی نمی‌باشد) که این امر را می‌توان ناشی از داشتن گرادیان رطوبتی پایین نمونه‌ها در این سرعت هوای خشک شدن با توجه به داشتن دماهای مختلف دانست. به عبارتی دیگر عامل موثر بر پیوستگی، محتوای رطوبتی است که اگر نمونه‌ها دارای محتوای رطوبتی

شکل‌های ۱۲ و ۱۳ نشان می‌دهد که قابلیت ارتجاعی با کاهش محتوای رطوبت بصورت خطی افزایش یافته است. بنابراین نمونه‌های خشک شده ویژگی ارتجاعی بیشتری نسبت به نمونه‌های با رطوبت بیشتر داشتند (Ferreira *et al.*, 2008). این امر ناشی از رفتار ویسکوالاستیک محصولات کشاورزی است که با داشتن محتوای رطوبت بیشتر رفتار ویسکوزتر از خود نشان داده و با کاهش محتوای رطوبت رفتارشان الاستیک تر می‌شود (Adhikari *et al.*, 2001). در حالت الاستیک ماده قدرت جذب و بازیابی انرژی ذخیره شده در زمان فشردن را دارا می‌باشد. این نمودار همچنین نشان می‌دهد که نرخ تغییر در سرعت‌های مختلف متفاوت است به نحوی که اختلاف این ویژگی در محصول خشک شده بیشتر از تر است. بیشینه قابلیت ارتجاعی در کمترین سرعت خشک کردن رخ داده است.



شکل ۱۲- تغییرات ویژگی قابلیت ارتجاعی نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد

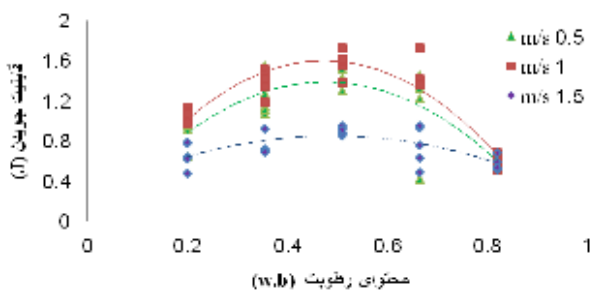
تغییرات قابلیت ارتجاعی در دماهای مختلف و سرعت ۱ متر بر ثانیه در شکل ۱۳ نمایش داده شده است. نمودار دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد دارای شیب کمتر نسبت به دو دمای ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد است. همان طور که بیان شد علت این مسئله خشک شدن بیشتر لایه‌های سطحی نمونه‌ها در دمایی بالاتر می‌باشد که این امر با توجه به میزان تغییر شکل ۵ میلی‌متر در نظر گرفته شده در نمونه‌های خشک شده با دمای بیشتر باعث بروز ویژگی‌های الاستیک تر از نمونه‌ها می‌شود.



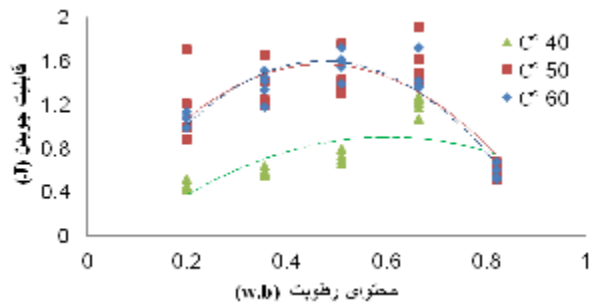
شکل ۱۳- تغییرات ویژگی قابلیت ارتجاعی نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در سرعت ۱ متر بر ثانیه

قابلیت جویدن

تغییرات ویژگی قابلیت جویدن در روش‌های مختلف خشک شدن در شکل‌های ۱۸ و ۱۹، نشان داده شده است. همانطور که در این شکل‌ها مشهود است قابلیت جویدن با کاهش محتوای رطوبت ابتدا روندی صعودی و سپس نزولی به خود می‌گیرد و باعث شده رفتار این خصوصیت به صورت سهمی باشد به گونه‌ای که قابلیت جویدن نهایی بافت گلابی خشک شده با میوه تازه تفاوت آنچنان نداشته باشد. Ferreira و همکاران (۲۰۰۸) و Shafiu و همکاران (۲۰۰۵) نتایج مشابهی را نیز گزارش کرده‌اند. علت این امر را می‌توان در این دانست که با کاهش محتوای رطوبتی گلابی سختی بافت نمونه‌ها کاهش می‌یابد ولی پیوستگی و قابلیت ارتجاعی افزایش می‌یابد بنابراین حاصل ضرب این سه پارامتر در واقع همان قابلیت جویدن، رفتاری سهمی از خود نشان می‌دهد. البته تغییر شکل کم اعمال شده بر روی نمونه‌ها همانطور که فریرا و همکاران اظهار داشتند (تغییر شکل در تحقیق آن‌ها نیز ۵ میلی‌متر در نظر گرفته شده بود)، بر نداشتن اختلاف بین مقادیر قابلیت جویدن نمونه‌های خشک نشده و خشک شده موثر است.



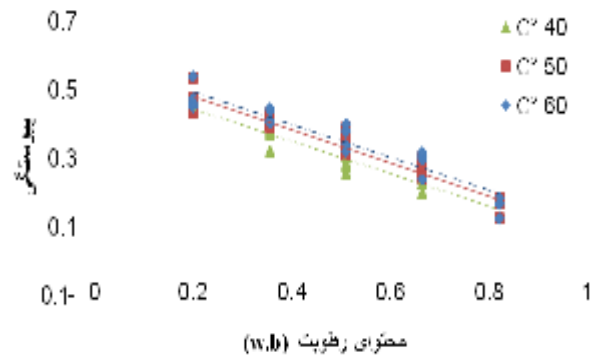
شکل ۱۸- تغییرات ویژگی قابلیت جویدن نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد



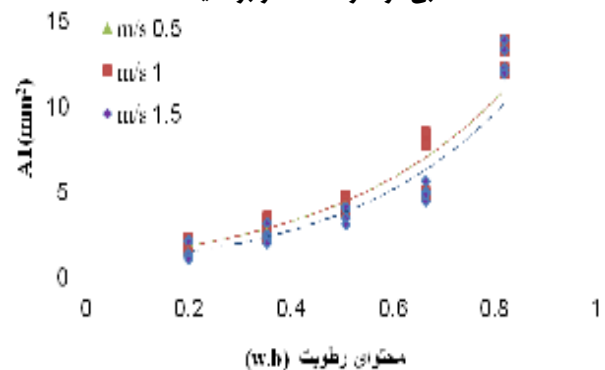
شکل ۱۹- تغییرات ویژگی قابلیت جویدن نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در سرعت ۱ متر بر ثانیه

تغییرات قابلیت جویدن در دماهای مختلف خشک شدن و سرعت ۱ متر بر ثانیه در شکل ۱۸ نشان داده شده است. منحنی دمای ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌دار با هم نشان نمی‌دهند (جدول ۳) و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مقادیر قابلیت جویدن کمتری را

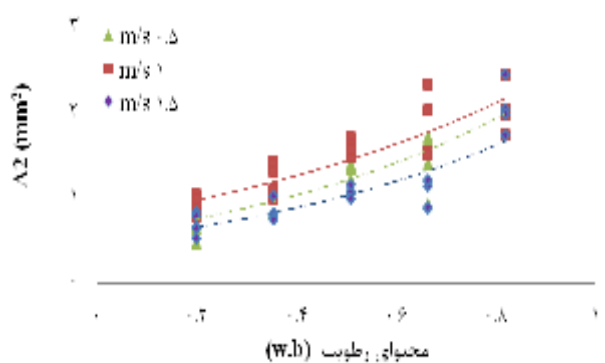
یکنواخت (گرادیان رطوبتی پایین) باشند پیوستگی آن‌ها تفاوتی را نسبت بهم نشان نمی‌دهند. نتایج مشابه توسط مدینا تورس^۱ و همکاران (۲۰۰۸) برای این ویژگی طی خشک کردن انجیر هندی گزارش شده است که تغییرات دما بر این ویژگی تاثیر معنی‌دار نداشته ولی اثر تغییرات سرعت هوای خشک کردن معنی‌دار بوده است



شکل ۱۵- تغییرات ویژگی پیوستگی نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در سرعت ۱ متر بر ثانیه



شکل ۱۶- تغییرات سطح زیر نمودار در سیکل فشار اول نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد



شکل ۱۷- تغییرات سطح زیر نمودار در سیکل فشار دوم نسبت به محتوای رطوبتی گلابی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد

نسبت به دو دمای دیگر نشان می‌دهد (همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است این تفاوت معنی‌دار بوده است). دلیل این امر را می‌توان داشتن مقادیر کمتر سختی و قابلیت ارتجاعی در این دما دانست.

جدول ۱- شیب منحنی‌های A₁ و A₂ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، محتوای رطوبتی مختلف و سرعت هوای خشک‌کن مختلف

محتوای رطوبت گلابی (بر پایه‌ی تر)				سرعت هوا		سطح زیر
۰/۸۲	۰/۶۶۵	۰/۵۱	۰/۳۵۵	۰/۲	(متر بر ثانیه)	منحنی
۳۱/۶۸	۲۰/۲۶	۱۲/۹۵	۸/۲۸	۵/۳۰	۰/۵	A ₁
۳۱/۷۲	۲۰/۲۸	۱۲/۹۷	۸/۲۹	۵/۳۰	۱	
۳۱/۹۲	۱۹/۶۵	۱۲/۱۰	۷/۴۵	۴/۵۹	۱/۵	
۳/۱۳	۲/۴۵	۱/۹۲	۱/۵۱	۱/۱۸	۰/۵	A ₂
۲/۸۰	۲/۲۹	۱/۸۸	۱/۵۳	۱/۲۶	۱	
۲/۵۲	۱/۹۹	۱/۵۸	۱/۲۵	۰/۹۹	۱/۵	

مطابق نتایج جدول ۳، سختی نمونه‌های خشک شده در شرایط دمای ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت هوای ۰/۵ و ۱/۵ متر بر ثانیه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. دلیل این امر را می‌توان افزایش پتانسیل جذب رطوبت هوای خشک‌کن در دما و سرعت هوای بالاتر دانست که باعث خروج بیشتر رطوبت از لایه‌های بیرونی نمونه نسبت به لایه‌های درونی نمونه شده و در نتیجه نمونه‌ها در لایه‌های سطحی خود، سختی بیشتری را نشان می‌دهند به نحوی که سختی نمونه خشک شده در این دو دما در مقایسه با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بطور میانگین ۳۳/۳ درصد بیشتر بوده است که در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. همچنین از مقادیر جدول مشخص است که سرعت هوای خشک کردن تاثیر معکوس بر ویژگی‌های چسبندگی و قابلیت ارتجاعی دارد به عبارتی با افزایش سرعت هوای خشک کردن چسبندگی افزایش و قابلیت ارتجاعی کاهش یافته است. مقایسه میانگین اثرات دما و سرعت هوا بر ویژگی قابلیت جویدن در جدول ۳ نشان می‌دهد که دماهای هوای ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد دارای تفاوت معنی‌دار با هم نیستند و سرعت هوای ۱/۵ متر بر ثانیه با دیگر سرعت‌ها تفاوت معنی‌دار دارد. افزون بر این، مطابق جدول ۲ ویژگی‌هایی که بطور معنی‌دار تحت تاثیر معنی‌دار برهمکنش (اثر متقابل) دما و سرعت هوای خشک‌کن هستند (بجز پوستگی)، در سطوح بالای دما و سرعت دارای اختلاف بیشتری نسبت به سطوح پایین بودند.

تاثیر دما و سرعت هوای خشک‌شدن بر تغییر ویژگی‌های بافتی گلابی حین خشک شدن

مقادیر پارامتر آماری F حاصل از تجزیه واریانس اثر دما و سرعت هوا و اثرات متقابل بین آن‌ها بر ویژگی‌های بافتی گلابی در حین خشک شدن در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که دمای هوای خشک کردن تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر ویژگی‌های سختی، قابلیت ارتجاعی و قابلیت جویدن دارد ولی تاثیر آن بر پیوستگی و چسبندگی معنی‌دار نیست. همچنین مشخص است که تاثیرات سرعت هوا بر تمام این ویژگی‌های معنی‌دار است و با توجه به داشتن مقادیر بالای F نسبت به دمای هوا، شدت اثر آن بیشتر از دمای هوا می‌باشد. دلیل این امر را می‌توان در تاثیر بیشتر سرعت هوای خشک کردن بر ایجاد اختلاف شیب رطوبتی بیشتر مخصوصاً در لایه‌های سطحی نمونه‌ها دانست.

همانطور که در بخش ۲-۳ بیان شد تغییر محتوای رطوبتی تاثیر معنی‌داری ($p < 0/01$) بر ویژگی‌های بافتی نمونه‌های گلابی دارد و با توجه به مقادیر بیشتر F اثر آن نسبت به سایر پارامترهای آزمون، بجز در مورد ویژگی قابلیت جویدن، در سایر ویژگی‌ها بالاتر می‌باشد. سرعت هوای خشک کردن موثرترین پارامتر بر خاصیت قابلیت جویدن می‌باشد. مقایسه میانگین اثرات عامل‌های اصلی دما و سرعت هوا بر ویژگی‌های بافتی در رطوبت ۲۰ درصد بر پایه وزن مرطوب گلابی خشک شده در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲- مقادیر پارامتر آماری F برای اثر دما و سرعت هوا بر ویژگی‌های بافتی گلابی در حین خشک شدن

منابع تغییرات	درجه آزادی	سختی (N)	چسبندگی (J)	قابلیت ارتجاعی (mm)	پیوستگی	قابلیت جویدن (J)
دمای هوا	۲	۱۴*	۲/۹ ^{ns}	۳۲/۳*	۵/۳ ^{ns}	۱۹/۹*
سرعت هوا	۲	۲۶*	۴۲*	۵۴/۶*	۶۶/۲*	۱۹/۱۶*
دمای هوا × سرعت هوا	۴	۷/۱*	۷*	۳۹/۶*	۰/۹ ^{ns}	۹/۵*

* نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪ و ns نشان دهنده عدم معنی‌داری است)

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات دما و سرعت هوا خشک کردن بر ویژگی‌های بافتی گلابی خشک شده

قابلیت جویدن (J)	پیوستگی	قابلیت ارتجاعی (mm)	چسبندگی (J)	سختی (N)	تیمار
۰/۵۷ ^b	۰/۴۶ ^a	۲/۹۶ ^b	۰/۵۶ ^a	۰/۴۲ ^b	دمای هوا
۰/۹۶ ^a	۰/۴۹ ^a	۳/۲۹ ^a	۰/۵۹ ^a	۰/۵۸ ^a	(درجه سانتی‌گراد)
۰/۸۸ ^a	۰/۴۹ ^a	۳/۳۸ ^a	۰/۶۲ ^a	۰/۵۴ ^a	۴۰
۰/۸۸ ^A	۰/۵۵ ^A	۳/۵۹ ^A	۰/۳۳ ^C	۰/۴۵ ^B	۵۰
۰/۹۰ ^A	۰/۴۶ ^B	۳/۱۴ ^B	۰/۶۶ ^B	۰/۶۰ ^A	۶۰
۰/۶۳ ^B	۰/۴۴ ^B	۲/۹۰ ^C	۰/۸۸ ^A	۰/۵۰ ^B	سرعت هوا
					(متر بر ثانیه)
					۱
					۱/۵

(حروف مشابه در ستون هر عامل اصلی نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است)

نتیجه‌گیری

از نظر قابلیت جویدن تولید گردد. بر این اساس استفاده از روش استراحت‌دهی نیز می‌تواند مد نظر باشد که در پژوهش‌های بعدی قابل بررسی است. با توجه به نتایج عینی بدست آمده کمترین مقدار قابلیت جویدن (۰/۴۶ ژول) مربوط به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱ متر بر ثانیه بوده و این تیمار بعنوان مطلوب‌ترین تیمار خشک کردن گلابی پیشنهاد می‌گردد.

با توجه به نتایج سرعت هوای خشک‌کن مخصوصاً در دماهای بالا باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در ویژگی‌های بافت محصول می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود در صورت نیاز به استفاده از دماهای بالا برای خشک شدن از سرعت هوای پایین‌تر استفاده شود تا با یکنواخت تر شدن شیب (گرادیان) رطوبتی محصول نهایی بهتری

منابع

- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, T., & Truong, V. (2001). Stickiness in foods: a review of mechanisms and test methods. *International Journal of Food Properties*, 4(1), 1-33.
- Akpınar, E., Midilli, A., and Bicer, Y. (2003). Single layer drying behaviour of potato slices in a convective cyclone dryer and mathematical modeling. *Energy Conversion and Management*, 44, 1689-1705.
- Bourne, M. C. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement* (2nd edition). New York: Elsevier *Science and Technology*.
- Earle, R. (1988). *Unit Operations in Food Processing*, second edition. Oxford: Pergamon Press, Ltd.
- Ferreira, D., Silva, J. L., Delgadillo, I., Coimbra, M., Pinto, G., & Santos, C. (2008). Effect of sun-drying on microstructure and texture of S. Bartolomeu pears (*Pyrus communis* L.). *European Journal of Food Research Technology*, 226, 1545-1552.
- Guine, R. (2006). Influence of drying method on density an prosity of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 84(C3), 179-185.
- Guine, R., Ferreira, D., Barroca, M., & Gonc-alves, F. (2007a). Study of the drying kinetics of solar-dried pears. *Biosystems Engineering*, 98, 422-429.
- Guine, R., Rodrigues, A., & Figueiredo, M. (2007b). Modelling and simulation of pear drying. *Applied Mathematics and Computation*, 192, 69-77.
- Hayashi, H. (1989). Drying technologies of foods – their history and future. *Drying Technology*, 7(2), 315-369.
- Heydari, M.M., Nassiri, S.M. (2015). Mathematical modeling of pear fruit thin layer drying and study on the effects of drying air temperature and velocity on variation of exhaust air relative humidity. *Journal of Food Science and Technology*, 48 (12), 215-229. (in persian)
- Janjai, S., Lamlert N., Intawee P., Mahayothee B., Haewsungcharern M., Bala B.K., Nagle M., Leis H., and Müller, J. (2008a). Finite element simulation of drying of longan fruit. *Drying Technology*, 26, 666-674.
- Janjai, S., Lamlert, N., Intawee, P., Mahayothee, B., Haewsungcharern, M., Bala, B.K., and Müller, J. (2008b). Finite element simulation of drying of mango. *Biosystems Engineering*, 99, 523-531.
- Khin, M. M., Zhou, W., & Yeo, S. Y. (2007). Mass transfer in the osmotic dehydration of coated apple cubes by using maltodextrin as the coating material and their textural properties. *Journal of Food Engineering*, 81, 514-522.
- Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J., Gonzalez-Laredo, R., & Rocha-Guzman, N. (2008). Drying kinetics of nopal (*Opuntia ficus-indica*) using three different methods and their effect on their mechanical properties. *LWT- Food science and Technology*; 41, 1183-1188.
- Moradi, M., & Zomorodian, A. (2009). Thin later drying of Cuminum Cyminum Grain by means of Solar Cabinet Dryer. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 5(3), 409-413.
- Nassiri, S. M., & Heydari Foroushani, M. M. (2014). Shrinkage and bulk density of pear fruit cubes as function of moisture content. *Acta Horticulture*, 1054: 253-260.

- Shafiurahman, M., & Sohrab, A. (2005). Instrumental texture profile analysis (TPA) of date flesh as a function of moisture content. *Journal of Food Engineering*, 66, 505–511.
- Togrul, I., & Pehlivan, D. (2002). Mathematical modelling of solar drying of apricots in thin layers. *Journal of Food Engineering*, 55, 209–216.
- Wang, C., & Singh, R. (1978). A single layer drying equation for rough rice. ASAE paper No. 78-3001, MI, USA: St. Joseph.
- Woods, J., & Phoungchandang, S. (2000). Solar drying of bananas: Mathematical model, laboratory simulation, and field data compared. *Journal of Food Science Food Engineering and Physical Properties*, 65(6), 990-996.
- Yagcioglu, A., Degirmencioglu, A., & Cagatay, F. (1999). Drying characteristic of laurel leaves under different conditions. In: Bascetinçelik A, editor. *Proceedings of the 7th International Congress on Agricultural Mechanization and Energy*. Turkey.
- Zomorodian, A. A., & Amanlou. (2010). Applying CFD for designing a new fruit cabinet dryer. *Journal of Food Engineering*, 101, 8-15.

Study on Textural Properties of Pear Fruit during Drying in a Cabinet Dryer

M. M. Heydari Foroushani¹, S. M. Nasiri ^{*2}

Received: 2014.01.10

Accepted: 2015.09.12

Introduction: Given that fruit drying is one of the best economical storing methods, in the present study attempt has been made to apply a commercial drying method, namely passing warm air through fruit in a cabinet drier, to pinpoint the change in textural properties of pear fruit during drying at different inlet air temperature and velocity levels. The outcomes of the study can be used for optimizing the drier operation during drying (intelligent driers) to keep suitable textural properties of final product for those who use sweet dried fruit as sweetener due to diabetic issues.

Materials and method: Pear fruits, Shah Miveh cultivar, were collected from a garden near Isfahan city and carried to the laboratory carefully. Experimental samples with 2×2.5×2.5 cubic centimeter dimension were prepared from upper part of pear fruits. A conventional cabinet drier was used for drying the pear cubes with adjustable inlet drying air temperature and velocity. Air temperature and velocity were adjusted at three levels of 40, 50 and 60 °C, and 0.5, 1 and 1.5 m/s, respectively. Initial moisture content was measured by gravimetric methods and samples weight loss measured during drying by an online system comprising hooked type balance with ±0.001 accuracy. Dried samples were then subjected to texture profile analysis (TPA) with Instron (Santam-STM 20). Two-bite test was performed with 20 mm diameter aluminum probe, at 1 mm/s speed rate for 5 mm deformation. Textural properties of samples such as hardness, cohesiveness, adhesiveness, springiness and chewiness were drawn from force-time curve. Textural properties were measured at five sample moisture contents of 82, 66, 51, 35 and 20 percent (w.b.). Data were analyzed according to the factorial experiments based on completely randomized design by SPSS software (version 16), and the means were compared by Duncan multiple range test at 5 percent of significance.

Results and Discussion: Mean comparison of drying time significantly affected by air temperature and velocity, and the effect of temperature was more than air velocity. Results revealed that textural properties of samples have changed during drying process and these changes were related to drying conditions. Hardness decreased exponentially and adhesiveness decreased linearly as fruits were being dried, whereas springiness and cohesiveness increased linearly. Chewiness followed a parabolic trend, reached to the peak in the range of 40 to 50 % moisture content levels (wet basis). ANOVA showed that drying air temperature had significant influence on hardness, springiness and chewiness, while its influence on adhesiveness and cohesiveness was not significant. Moreover, it was found that air drying velocity affected all aforementioned properties. Having considered the results of dried pear chewiness, the minimum chewiness (0.46 J) took place at air drying temperature of 40 °C and velocity of 1m/s, and therefore it is recommended as the best drying condition. Drying time period at this condition was measured nearly 33.5 hours, which was approximately 24 hours more than the shortest one in the drying condition of 60°C and 1.5 m/s and 6.5 hours lower than the longest one in drying condition of 40°C and 0.5 m/s.

Keywords: Pear fruit, Drying, Textural properties, Cabinet dryer.

1 And 2-Msc student and Assistant Professor Department of Biosystems Engineering, Shiraz University, Shiraz, Iran.
(*-Corresponding Author Email: mnasiri@shirazu.ac.ir)

بررسی اثر شرایط خشک کردن در خشک کن کابیتی و پیش تیمارهای مختلف بر شدت خشک

شدن انگور و ویژگی‌های کیفی کشمش

اعظم ایوبی^۱، ناصر صداقت^{۲*}، مهدی کاشانی نژاد^۳، محبت محبی^۴، مهدی نصیری محلاتی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۱۸

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی تاثیر شرایط خشک کردن (دمای خشک کردن در سه سطح (۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و سرعت جریان هوا در دو سطح (۱/۵ و ۲/۵ متر بر ثانیه)) و پیش تیمار آماده‌سازی در چهار سطح (کربنات پتاسیم و روغن سبزه، روغن زیتون، آب داغ و بدون پیش تیمار آماده-سازی) بر شدت خشک شدن انگور و برخی ویژگی‌های کیفی کشمش شامل بازجذب آب، چروکیدگی، سفتی بافت و شاخص قهوه‌ای شدن انجام شد. نتایج نشان داد که پارامترهای دما، سرعت هوا و پیش تیمار آماده‌سازی اثرات معنی‌داری بر شدت خشک شدن انگور و کیفیت کشمش دارند. افزایش دما و سرعت هوای خشک کننده و نیز استفاده از پیش تیمار آماده‌سازی موجب افزایش شدت خشک شدن انگور شد. مطلوب‌ترین مقادیر سفتی (۰/۷۳ نیوتن)، چروکیدگی (۸۱/۰۴ درصد) و کمترین شاخص قهوه‌ای شدن (۰/۱۵۷) مربوط به کشمش خشک شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بیشترین بازجذب آب (۱/۲۶۶) مربوط به کشمش خشک شده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. تاثیر سرعت جریان هوای خشک کننده، تنها بر شاخص قهوه‌ای شدن معنی‌دار شد. افزایش سرعت جریان هوا، کاهش شاخص قهوه‌ای شدن را به دنبال داشت. در بین پیش تیمارهای بکار رفته نیز، پیش تیمار کربنات پتاسیم و روغن سبزه نتایج فیزیکوشیمیایی بهتری را سبب شد.

واژه‌های کلیدی: کشمش، خشک کردن، چروکیدگی، شدت خشک شدن، سفتی

مقدمه

آمار سازمان خوار و بار و کشاورزی جهانی (فائو) در سال ۲۰۱۲ ایران با صادرات ۱۳۴۰۵۹ تن کشمش و اختصاص سهم ۱۸ درصدی از صادرات این محصول، بعد از ترکیه و آمریکا، سومین صادرکننده کشمش در دنیا بشمار می‌رود، اما بررسی وضعیت کشمش ایران در بازارهای جهانی طی سالهای گذشته نشان می‌دهد که به دلیل عدم انطباق کیفیت این محصول با استانداردهای جهانی، کشمش تولیدی در ایران تقریباً به نصف قیمت جهانی به فروش می‌رسد (طوسی، ۱۳۸۸). در صورت بهبود شرایط فرآوری، حمل و نقل و انبارداری و تامین کیفیت مطلوب، درآمد ایران از فروش این محصول به مراتب افزایش خواهد یافت. فرایند خشک کردن انگور، یکی از مهم‌ترین مراحل فرآوری کشمش و از جمله عوامل موثر بر کیفیت کشمش می‌باشد. دستیابی به شرایط بهینه در فرایند خشک کردن صنعتی می‌تواند اثر مهمی بر زمان فرآوری و بهبود شاخص‌های کیفی این محصول داشته باشد. پارامترهای دما، سرعت جابجایی هوای گرم و روش آماده‌سازی اولیه انگور، از جمله عوامل اصلی مؤثر بر فرایند خشک شدن انگور محسوب شده و نقش مهمی را در کیفیت محصول نهایی ایفا می‌کنند. لذا بررسی اثر این عوامل بر ویژگی‌های محصول، به منظور طراحی مناسب خشک کن با جریان هوای داغ نیز ضروری

کشمش خشک شده میوه رسیده ارقام مختلف انگور با دانه و بی-دانه تازه حاصل از بوته مو از گونه ویتیس وینیفرآ از خانواده ویتاسه^۶ می‌باشد (قاسم‌زاده و همکاران، ۲۰۰۸). سالانه حدود ۶۸ میلیون تن، انگور در جهان تولید می‌شود که ایران با تولید حدود ۳ میلیون تن، یازدهمین تولیدکننده این میوه در جهان بشمار می‌رود. سطح زیر کشت انگور در ایران حدود ۳۱۰ هزار هکتار است^۷ و بر اساس آخرین

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲ و ۴- به ترتیب دانشیار و استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۵- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
(* نویسنده مسئول: Email: sedaghat1@yahoo.com)

6Vitis vinifera
7Vitaceae

۸- گزارش خبرگزاری دانشجویان ایران ایسنا (۲۷ آذر ۱۳۹۱)

با محلول اسید آسکوربیک و بی سولفیت سدیم با افزایش دمای خشک کردن توسط پارین (۲۰۰۴) و کاهش نسبت بازجذب و ظرفیت نگهداری آب فلفل قرمز با افزایش دمای خشک کردن توسط وگا-کالوز و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شده است. نتایج بررسی دویماز و کوکاییگیت (۲۰۱۱) نشان داد که استفاده از پیش تیمار آماده سازی، سبب افزایش ظرفیت بازجذب آب نخود سبز شد. این محققین افزایش سرعت خشک شدن و کاهش میزان چروکیدگی محصول را دلیل احتمالی این مسئله بیان نمودند. افزایش بازجذب آب توت فرنگی با افزایش دمای خشک کردن و همچنین هنگام استفاده از پیش تیمار محلول قلیایی و اتیل اولئات توسط دویماز (۲۰۰۸) نیز گزارش شده است.

این پژوهش با هدف بررسی تاثیر شرایط خشک کردن (دما و سرعت جریان هوای خشک کننده) و پیش تیمار آماده سازی بر شدت خشک شدن انگور رقم عسگری و ویژگی های کیفی کشمش انجام شده است.

مواد و روش

مواد

انگور رقم عسگری از باغات شهرستان کاشمر تهیه و قبل از آماده سازی، در یخچال تحت دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. از روغن سبزه پاکسان، کربنات پتاسیم با درجه خوراکی^۲ و روغن زیتون اوپلا برای تهیه محلول های پیش تیمار آماده سازی استفاده شد. برای تعیین ویژگی های اولیه انگور ۳ نمونه ۱۰۰ گرمی برای هر ویژگی به طور تصادفی انتخاب شد. محتوای قند انگور (شاخص بریکس) به کمک رفراکتومتر دستی، قطر حبه های انگور به وسیله کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی متر و رطوبت اولیه انگور طبق روش استاندارد ملی ایران شماره ۶۷۲ (روش اندازه گیری رطوبت در خشکبار) توسط آون تحت خلاء در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت تعیین شد. میانگین شاخص بریکس برای حبه های انگور برابر $1 \pm 24/1$ درصد، میانگین رطوبت اولیه انگور 2 ± 77 درصد و میانگین قطر حبه های انگور برابر $1/1 \pm 1/16$ سانتی متر بود. جهت خشک کردن نمونه ها، از خشک کن غیرمداوم کابینتی تک فاز مجهز به سه سینی مشبک ساخت شرکت طب سروش مشهد استفاده شد. برای کنترل دمای دستگاه، از ترموکوپل K در طراحی دستگاه استفاده شده بود. دامنه عملکرد دمایی این ترموکوپل بین ۲۰۰- تا ۱۳۵۰+ درجه سانتیگراد است و به دلیل ضریب اطمینان بالا و قیمت مناسب بیشترین استفاده را در صنعت دارد. گردش هوا در دستگاه از طریق دمنده های گریز از مرکز انجام می شد. سرعت هوای در این دستگاه ثابت و معادل ۱/۵

می باشد (غلامی و رشیدی، ۱۳۸۸). تغییر شکل، کاهش حجم و افزایش سفتی محصول طی فرایند خشک کردن، عدم تمایل مصرف کنندگان به مصرف این گونه فرآورده ها را به دنبال دارد. البته در برخی از محصولات آبگیری شده نظیر انواع برگه و کشمش، ظاهر محصول با میزان چروکیدگی خاص با پذیرش مصرف کنندگان همراه است (مایور و سرنو، ۲۰۰۴). مقایسه روش های آماده سازی انگور و اثرات آنها بر روی رنگ فرآورده نهایی توسط مکلیلان و همکاران (۱۹۹۵) نشان داد که آماده سازی با عسل باعث ایجاد رنگ زرد در فرآورده نهایی می گردد و رنگ روشنتری را نسبت به محلول سولفوریک سبب می شود. عزیزاده و همکاران (۲۰۱۰) تاثیر فاکتورهای روش آماده سازی قبل از خشک کردن، دمای نگهداری و رطوبت محیط را بر روی ویژگی های بافتی کشمش بررسی نمودند و دریافتند که آماده سازی، در مقدار کار لازم برای تغییر شکل مؤثر بوده و رطوبت محیط نگهداری خواص مکانیکی کشمش را به شدت تحت تأثیر قرار می دهد. نتایج مطالعه اکسیانو و همکاران (۲۰۱۰) بر رفتار خشک شدن انگور نشان داد که تاثیر دمای هوای خشک کننده بر زمان خشک شدن انگور، بیشتر از تاثیر سرعت هوای خشک کننده است و افزایش دمای هوای خشک کننده باعث افزایش سفتی بافت انگور خشک شده می شود. دمای خشک کردن ۶۰ درجه سانتیگراد، سرعت جابجایی هوا بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ متر بر ثانیه، آماده سازی در محلول ۲/۵ درصد کربنات پتاسیم و ۲ درصد روغن سولفاتین به عنوان شرایط بهینه در خشک کردن انگور بی دانه بیان شده است (ایسن و همکاران، ۱۹۸۵). مطالعات نشان داده است که لطافت و نرمی کشمش به میزان مواد جامد محلول انگور، روش خشک کردن، میزان رطوبت و استفاده از پیش تیمار آماده سازی قبل از خشک کردن وابسته است (جلیلی مرندي، ۱۳۸۴). ضرابی (۱۳۷۷) دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و محلول ۵ درصد کربنات پتاسیم با ۲ درصد روغن سبزه^۱ با زمان تماس ۵ دقیقه را بعنوان بهترین روش آماده سازی انگور سفید پیشنهاد نمود. پهلوان زاده و همکاران (۲۰۰۲) دریافتند که غوطه وری انگور سفید بی - دانه ایرانی (سلطانی) در محلول قلیایی سرعت خشک کردن را افزایش می دهد و بهترین کیفیت محصول خشک شده مربوط به نمونه تیمار شده با محلول کربنات پتاسیم ۵ درصد در ۴۲ درجه سانتیگراد می باشد. در حین خشک شدن، آب از بخش های داخلی به سطح و محیط اطراف ماده غذایی منتقل شده و به ساختار سلولی ماده غذایی تنش وارد نموده و با ایجاد تغییرات ساختاری، ویژگی های فیزیکی آنها را تغییر می دهد (شفافی، ۱۳۸۶؛ باربوسا، ۱۹۹۶؛ یان و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش ظرفیت بازجذب آب کنگر پیش تیمار شده

۱- روغن سبزه یک مایع شفاف به رنگ زرد کم رنگ است که طی دو مرحله از اسید چرب کلزا حاصل می شود. از ترکیب این روغن با کربنات پتاسیم تیزاب تهیه می گردد.

محاسبه شدت خشک شدن

برای محاسبه شدت خشک شدن در هر زمان از فرآیند خشک شدن، اختلاف وزن نمونه در آن زمان و زمان بعدی اندازه‌گیری وزن محاسبه گشت. عدد حاصل بر وزن ماده خشک تقسیم و سپس عدد به دست آمده بر مدت زمان بین دو اندازه‌گیری (۶۰ دقیقه یا یک ساعت) تقسیم شد. عدد نهایی شدت خشک شدن بر حسب کیلوگرم آب بر کیلوگرم ماده خشک در ساعت را نشان می‌دهد (کانواس و مرکادو، ۱۹۹۶).

بازجذب آب

برای اندازه‌گیری میزان بازجذب آب، نمونه کُشش توزین شده به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شد. سپس نمونه‌های مرطوب شده آبکشی شده و دوباره توزین شدند. نسبت بازجذب^۲ آب کُشش از رابطه زیر محاسبه شد:

$$(۱) \quad \text{نسبت بازجذب آب} = \frac{m}{m_0}$$

m_0 وزن اولیه نمونه و m وزن نمونه مرطوب بعد از بازجذب آب می‌باشد (کردپیون و همکاران، ۲۰۰۶).

چروکیدگی^۳

پدیده چروکیدگی به دلیل کاهش سطح موثر و سخت شدن پوسته، انتقال جرم را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر چروکیدگی با صدمه به لوله‌های موئین سبب کاهش آبیگری مجدد فرآورده‌های خشک شده نیز می‌شود (مایور و سرنو، ۲۰۰۴). لذا چروکیدگی می‌تواند به عنوان یک معیار تعیین میزان تغییرات ساختمانی طی فرایند خشک کردن محصول مورد استفاده قرار بگیرد. میزان چروکیدگی با توجه به تغییر حجم انگور قبل و بعد از خشک شدن تعیین شد. حجم انگورها از طریق جابجایی حجم مشخصی از n -هگزان در یک استوانه مدرج تعیین شد. سپس درصد چروکیدگی نمونه‌ها توسط رابطه زیر محاسبه شد:

$$(۲) \quad \text{درصد چروکیدگی} = \frac{v_i - v}{v_i} \times 100$$

در این رابطه v_i حجم اولیه نمونه قبل از خشک شدن و v حجم نمونه بعد از خشک شدن می‌باشد (کردپیون و همکاران، ۲۰۰۶).

سفتی بافت^۴

سفتی بافت با استفاده از دستگاه سنجش بافت مدل QTS-25 اندازه‌گیری شد. بدین منظور از یک پروب استوانه‌ای به قطر ۲ میلی-

متر بر ثانیه بود. برای ایجاد سرعت ۲/۵ متر بر ثانیه، از یک دمنده کمکی مدل Damandeh VMA.10S2S و دیمر برای تنظیم سرعت هوا استفاده شد. سرعت هوا با استفاده از سرعت‌سنج Testo در مرکز سینی دوم (محل قرار گرفتن نمونه) و در سطح مقطع تقریبی ۰/۱ متر مربع کنترل می‌گردید.

خشک کردن

قبل از شروع هر آزمایش خشک کردن، انگور از یخچال خارج شده و به منظور متعادل شدن با محیط تا رسیدن دمای آن به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. پس از شستشوی اولیه و آماده‌سازی محلول‌های پیش‌تیمار، نمونه‌ها به وسیله محلول‌های آماده‌سازی، تیمار شدند. پیش‌تیمارهای مورد استفاده در مرحله خشک کردن عبارت بودند از (غلامی و رشیدی، ۱۳۸۸؛ پنگوانه و همکاران، ۱۹۹۹؛ دویماز و آلتینر، ۲۰۱۲؛ شانموگاولو، ۲۰۰۳):

۱- پیش‌تیمار با محلول آبی ۲/۵ درصد وزنی/ وزنی کربنات پتاسیم و ۲ درصد روغن سبزه به مدت ۳ دقیقه غوطه‌وری در دمای محیط

۲- پیش‌تیمار با محلول آبی ۲ درصد وزنی/ وزنی روغن زیتون به مدت ۴ دقیقه غوطه‌وری در دمای محیط

۳- پیش‌تیمار با آب داغ با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه غوطه‌وری

۴- شاهد (بدون پیش‌تیمار آماده‌سازی)

لازم به ذکر است که از آب مقطر برای تهیه تمام محلول‌های آماده‌سازی استفاده شد. دماهای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد سطوح متغیر دمای خشک کردن و سرعت‌های ۱/۵ و ۲/۵ متر بر ثانیه سطوح متغیر سرعت جریان هوا بودند (غلامی و رشیدی، ۱۳۸۸؛ پنگوانه و همکاران، ۱۹۹۹؛ دویماز و آلتینر، ۲۰۱۲؛ شانموگاولو، ۲۰۰۳). حبه‌های انگور پس از انجام پیش‌تیمار آماده‌سازی به صورت یک لایه بر روی سینی‌ها پخش و در داخل محفظه خشک‌کن قرار داده شد. نمونه‌ها به طور مداوم در فواصل زمانی معین توسط ترازوی دیجیتال مدل FX3200 با دقت ± 0.01 گرم توزین می‌شدند. فرآیند خشک کردن به محض رسیدن مقدار رطوبت نمونه‌ها به ۱۳ درصد (بر پایه وزن مرطوب) متوقف شد. پس از خشک کردن، نمونه خشک شده در بسته‌های سه لایه (PE/PA/PE) با ابعاد ۲۰×۲۰ سانتیمتر مربع بسته‌بندی شده و تا انجام آزمون‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند.

2Rehydration Ratio

3 Shrinkage

4Hardness

1 Polyethylene/ Polyamid/ Polyethylene

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور ارزیابی اثر متغیرهای مورد بررسی (دما، سرعت هوا و پیش تیمار آماده‌سازی) بر شدت خشک شدن انگور و نیز بر خصوصیات کیفی کشمش از روش آنالیز واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل استفاده شد. داده‌های به دست آمده به کمک نرم افزار Mstat-C تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

اثر دما، سرعت هوا و پیش تیمار آماده‌سازی بر شدت خشک شدن

اثرات دما، سرعت جریان هوا و پیش تیمار آماده‌سازی بر شدت خشک شدن انگور در شکل‌های ۲ تا ۶ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است در یک سرعت ثابت هوای خشک کننده و برای یک پیش تیمار معین، با افزایش دمای هوای خشک کننده، شدت تبخیر رطوبت و در نتیجه شدت خشک شدن انگور افزایش یافته و بنابراین شیب منحنی نیز افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه اکسیا و همکاران (۲۰۱۰) بر روی رفتار خشک شدن انگور بی‌دانه منوکا نشان داد که دمای هوای خشک کننده در مقایسه با سرعت آن اثر واضحتری بر نرخ خشک کردن محصول دارد. افزایش شیب منحنی با افزایش سرعت جریان هوای خشک کننده در شکل ۳ نشان می‌دهد که در دمای ثابت هوای خشک کننده برای هر تیمار، افزایش سرعت جریان هوای خشک کننده موجب ازدیاد شدت خشک شدن محصول شده است. با توجه به اینکه افزایش سرعت جریان هوا سبب دور کردن رطوبت از اطراف ماده غذایی و جلوگیری از به وجود آمدن هوای اشباع می‌شود این نتیجه دور از انتظار نیست (مقصودی، ۱۳۸۹). مقایسه تغییرات شیب منحنی‌های شکل‌های ۴ تا ۶ نشان می‌دهد که طی زمان‌های مختلف خشک کردن محصول تحت دما و سرعت ثابت خشک کننده، بیشترین شدت خشک شدن مربوط به پیش تیمار آماده سازی کربنات پتاسیم و روغن سبزه و کمترین شدت خشک شدن مربوط به نمونه شاهد بوده است. طی فرایند خشک کردن انگور، ضخامت کوتیکول مومی به دلیل پدیده چروکیدگی افزایش یافته و در نتیجه نفوذپذیری آب کاهش می‌یابد. از آنجا که بررسی‌ها نشان داده است که پیش تیمار شیمیایی انگور مقاومت پوست را کاهش داده و نفوذ آب در کوتیکول مومی را بهبود می‌بخشد، دستیابی به چنین نتایجی دور از انتظار نمی‌باشد (پنتینگ و مکین، ۱۹۷۰). دیمتیو و همکاران (۲۰۰۰) نیز دریافتند که غوطه‌وری انگور در اتیل‌اولئات سبب حل شدن ترکیبات لایه مومی سطح انگور و تغییر ساختار این لایه می‌شود و در نتیجه مقاومت این لایه به نفوذ آب کاهش یافته و سرعت خشک شدن انگور افزایش می‌یابد. غلامی

متر با سر سوزنی که در گروه ماشین آلات کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد ساخته شده بود استفاده گردید. اندازه‌گیری سفتی بافت با آزمون نفوذ با سرعت حرکت پروب ۶۰ میلی‌متر در دقیقه و عمق نفوذ ۲ میلی‌متر در نمونه و تعداد هر سیکل آزمون یک بار انجام شد.

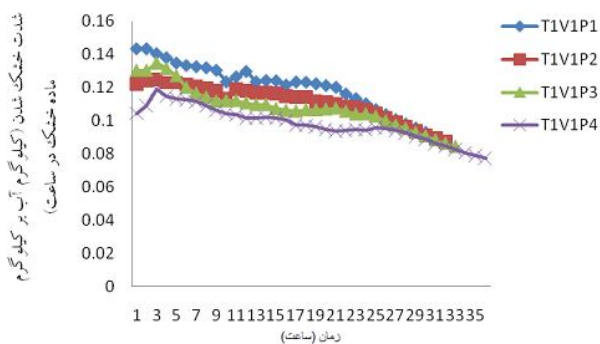
برای هر تیمار ۱۰ عدد کشمش به طور تصادفی انتخاب و پس از اعمال نیرو توسط پروب، میانگین نیروی لازم برای نفوذ پروب تا عمق تعریف شده در کشمش بر حسب نیوتن به عنوان سفتی بافت در نظر گرفته شد (رول و همکاران، ۲۰۱۲). شکل ۱ پروب مورد استفاده در تعیین سفتی بافت کشمش را نشان می‌دهد.



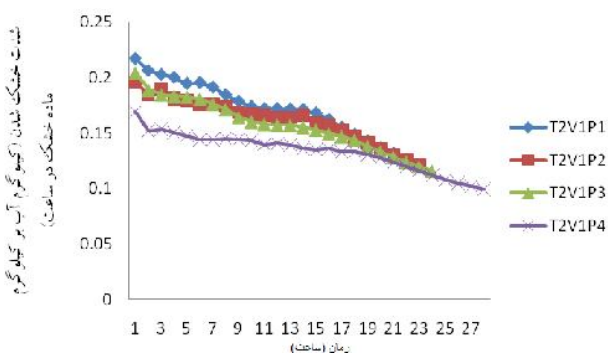
شکل ۱- تصویر پروب مورد استفاده در تعیین سفتی بافت کشمش

شاخص قهوه‌ای شدن

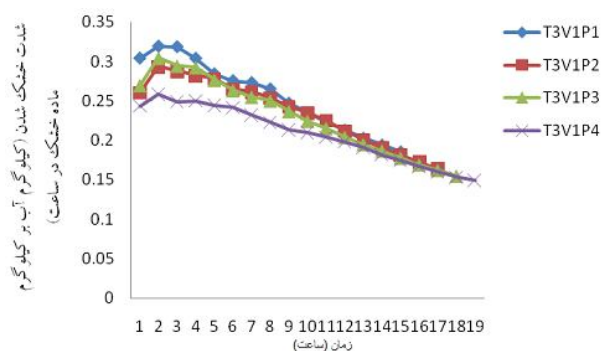
میزان قهوه‌ای شدن بر اساس روش بلوچ و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. این روش بر مبنای استخراج رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای توسط ۵۰ میلی‌لیتر از محلول آبی اسید استیک-فرمالدئید (نسبت ۲ به ۱ حجمی) و اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۴۲۰ و ۶۰۰ نانومتر استوار است. بدین منظور ۵ گرم از هر نمونه کشمش وزن و در داخل ارلن ریخته شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر از محلول آبی اسید استیک-فرمالدئید بر روی نمونه‌ها ریخته شده و هم زده شد. نمونه‌های آماده شده به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی قرار داده شدند تا رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای آنها کاملاً استخراج شود. پس از گذشت این زمان، محلول رنگی بالای نمونه‌ها با کاغذ صافی واتمن صاف شده و مقدار جذب این محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل S2000 uv/vis light wave در طول موج‌های ۴۲۰ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. طول موج ۴۲۰ نانومتر مربوط به ناحیه زرد و طول موج ۶۰۰ نانومتر مربوط به ناحیه قهوه‌ای است. اختلاف جذب در این دو طول موج بعنوان شاخص قهوه‌ای شدن در نظر گرفته شد (بلوچ و همکاران، ۱۹۷۳).



شکل ۴- اثر پیش تیمار آماده‌سازی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بر شدت خشک شدن (T1) دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، V1 سرعت هوای ۱/۵ متر بر ثانیه، P1 پیش تیمار آماده‌سازی کربنات پتاسیم و روغن سبزه، P2 پیش تیمار آماده‌سازی روغن زیتون، P3 پیش تیمار آماده‌سازی آب داغ، P4 شاهد

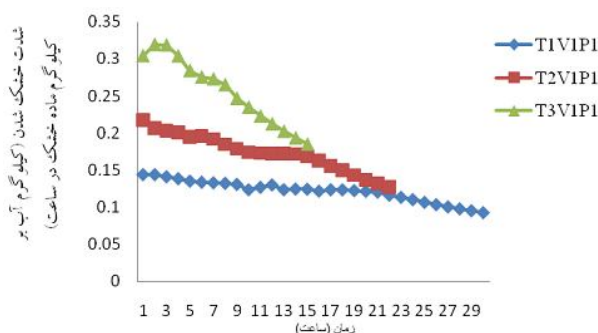


شکل ۵- اثر پیش تیمار آماده‌سازی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بر شدت خشک شدن (T2) دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، V1 سرعت هوای ۱/۵ متر بر ثانیه، P1 پیش تیمار آماده‌سازی کربنات پتاسیم و روغن سبزه، P2 پیش تیمار آماده‌سازی روغن زیتون، P3 پیش تیمار آماده‌سازی آب داغ، P4 شاهد

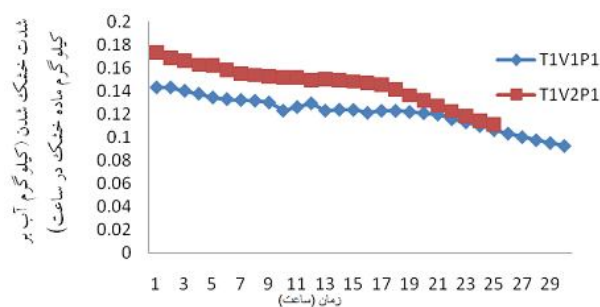


شکل ۶- اثر پیش تیمار آماده‌سازی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بر شدت خشک شدن (T3) دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، V1 سرعت هوای ۱/۵ متر بر ثانیه، P1 پیش تیمار آماده‌سازی کربنات پتاسیم و روغن سبزه، P2 پیش تیمار آماده‌سازی روغن زیتون، P3 پیش تیمار آماده‌سازی آب داغ، P4 شاهد

و رشیدی (۱۳۸۸) دریافتند که افزایش دمای هوای خشک‌کننده، افزایش سرعت جابجایی هوای گرم و استفاده از پیش تیمار آماده‌سازی هیدروکسید سدیم، زمان خشک کردن انگور بی‌دانه قرمز را به ترتیب تا ۶۶/۵، ۸/۳ و ۶۸ درصد کاهش می‌دهد. پهلوان‌زاده و همکاران (۲۰۰۲) غوطه‌وری انگور سفید بی‌دانه ایرانی (سلطانی) در محلول قلیایی و افزایش دمای هوای خشک‌کن را در افزایش سرعت خشک کردن موثر دانستند.



شکل ۲- اثر دما بر شدت خشک شدن (T1) دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، T2 دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، T3 دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، V1 سرعت هوای ۱/۵ متر بر ثانیه و P1 پیش تیمار آماده‌سازی کربنات پتاسیم و روغن سبزه



شکل ۳- اثر سرعت هوا بر شدت خشک شدن (T1) دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، V1 سرعت هوای ۱/۵ متر بر ثانیه، V2 سرعت هوای ۲/۵ متر بر ثانیه و P1 پیش تیمار آماده‌سازی کربنات پتاسیم و روغن سبزه

شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بالا بودن میزان صدمات بافتی و سفتی کشمش خشک شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد دلیل بازجذب پایین‌تر این نمونه‌ها نسبت به کشمش خشک شده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. استفاده از پیش‌تیماز آماده‌سازی سبب افزایش بازجذب آب کشمش شد. پدیده چروکیدگی، ظرفیت بازجذب آب محصول را کاهش می‌دهد (مایور و سرنو، ۲۰۰۴)، از طرف دیگر نتایج این بررسی نشان می‌دهد که استفاده از پیش‌تیماز آماده‌سازی چروکیدگی را کاهش داده است. لذا بنظر می‌رسد که کاهش چروکیدگی هنگام استفاده از پیش‌تیماز آماده‌سازی، افزایش بازجذب آب محصول را به دنبال داشته است. در بین پیش‌تیمارهای به کار رفته، پیش‌تیماز کربنات پتاسیم بیشترین تاثیر را بر بازجذب آب کشمش گذاشت. ایجاد ترک‌های بسیار ریز در پوست و کاهش ضخامت پوست انگور در اثر آماده‌سازی، نیز می‌تواند دلیل بالا بودن جذب آب کشمش پیش‌تیماز شده با محلول قلیایی باشد. به علاوه آماده‌سازی شیمیایی، نقاط جذب آب در پوست میوه را افزایش می‌دهد (وازکوز و همکاران، ۲۰۰۰). به نظر می‌رسد که استفاده از پیش‌تیماز آب داغ نیز با کاهش چسبندگی ماتریکس میوه، جذب آب را بهبود می‌دهد و منجر به افزایش میزان بازجذب آب محصول نهایی می‌شود. چنین نتیجه‌ای هنگام استفاده از پیش‌تیماز آنزیم‌بری در خشک کردن فلفل توسط کایمک-ارتکین (۲۰۰۲) نیز گزارش شده است. طبق گزارشات، پیش‌تیماز حرارتی بر نفوذپذیری غشاء سلولی نیز تاثیر می‌گذارد (آلوارز و همکاران، ۱۹۹۴).

اثر دما، سرعت هوا و پیش‌تیماز آماده‌سازی بر چروکیدگی کشمش

دمای هوای خشک‌کننده بطور معنی‌داری بر چروکیدگی کشمش تاثیر گذاشت ($P \leq 0.01$)؛ به طوری که با افزایش دمای خشک کردن، چروکیدگی کشمش کاهش یافت. چروکیدگی کشمش بطور معنی‌داری تحت تاثیر پیش‌تیماز آماده‌سازی نیز قرار گرفت ($P \leq 0.01$)؛ استفاده از پیش‌تیماز آماده‌سازی منجر به کاهش چروکیدگی کشمش شد. کمترین چروکیدگی مربوط به پیش‌تیماز کربنات پتاسیم و روغن سبزه و بیشترین چروکیدگی مربوط به شاهد بود، اگرچه نتایج مقایسه میانگین اختلاف معنی‌داری را بین چروکیدگی پیش‌تیماز p1 با پیش-تیماز p2 و پیش‌تیماز p3 با پیش‌تیماز p4 نشان نداد. جدول ۱ اثر دما و پیش‌تیماز آماده‌سازی را بر چروکیدگی کشمش نشان می‌دهد. زمانی که سطح میوه، بسیار سریع‌تر از مرکز آن خشک می‌شود تنش‌های درونی افزایش یافته و داخل میوه ترک می‌خورد و محصول متخلخل می‌شود (آگولرا و استتلی، ۱۹۹۹)، در این شرایط ترکیبات غیرفرار با انتشار آب به سطح میوه مهاجرت نموده، در آنجا رسوب می‌کنند و یک پوسته را در سطح محصول تشکیل می‌دهند. این پوسته به حفظ ابعاد محصول کمک می‌کند. این پدیده اغلب در سرعت‌های بالای

اثر دما، سرعت هوا و پیش‌تیماز آماده‌سازی بر بازجذب آب کشمش

بازجذب آب می‌تواند یک معیار ارزیابی صدمات ناشی از خشک کردن و یا تیمارهای قبل از خشک کردن باشد (ال-خوسیبی و همکاران، ۲۰۰۵). ظرفیت بازجذب آب، بطور معنی‌داری تحت تاثیر ویژگی‌های بافتی محصول قرار می‌گیرد (کایمک-ارتکین، ۲۰۰۲). بازجذب ضعیف، نتیجه فروپاشی ساختمان داخلی است (ال-خوسیبی و همکاران، ۲۰۰۵). زمانی که تخریب ساختمانی در سطح سلولی حداقل باشد بازجذب آب فرآورده حداکثر خواهد بود (کراپیست، ۲۰۰۰). از نظر تئوری در صورتی که خشک کردن اثرات نامطلوبی بر ساختمان و بافت محصول نداشته باشد محصول پس از خشک کردن به همان اندازه رطوبت اولیه قبل از خشک کردن آب جذب می‌کند (سنادرا و همکاران، ۲۰۰۰). کاهش ویژگی‌های هیدروفیلیک نیز منجر به کاهش توانایی بازجذب آب محصول می‌شود (مارگوس و همکاران، ۲۰۰۹). نتایج آنالیز واریانس نشان داد که بازجذب آب کشمش به طور معنی‌داری تحت تاثیر دمای خشک کردن و پیش‌تیماز آماده‌سازی قرار گرفت ($P \leq 0.01$)، اما اثر سرعت هوا و همچنین اثرات متقابل فاکتورهای مورد بررسی بر بازجذب آب کشمش معنی‌دار نبود (جدول ۱).

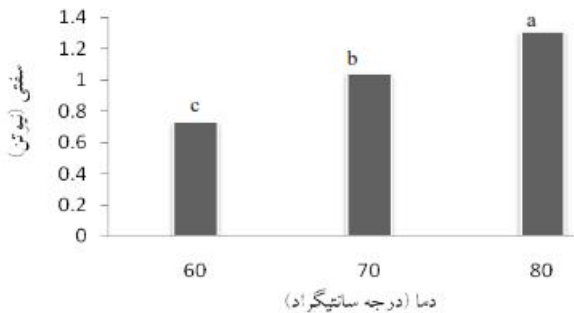
جدول ۱- اثر دمای خشک کردن و پیش‌تیماز آماده‌سازی بر بازجذب آب و چروکیدگی کشمش

فاکتور	سطح	بازجذب آب	چروکیدگی (درصد)
دما (درجه سانتی‌گراد)	۶۰	۱/۲۴۴ ^b	۸۱/۰۴ ^a
	۷۰	۱/۲۶۶ ^a	۷۷/۹۸ ^b
	۸۰	۱/۲۳۸ ^c	۷۴/۷۴ ^c
	P1	۱/۲۶۸ ^a	۷۶/۲۳ ^b
پیش‌تیماز آماده‌سازی	P2	۱/۲۶۷ ^b	۷۶/۴۹ ^b
	P3	۱/۲۵۸ ^c	۷۹/۳۵ ^a
	P4	۱/۲۰۴ ^d	۷۹/۶۰ ^a

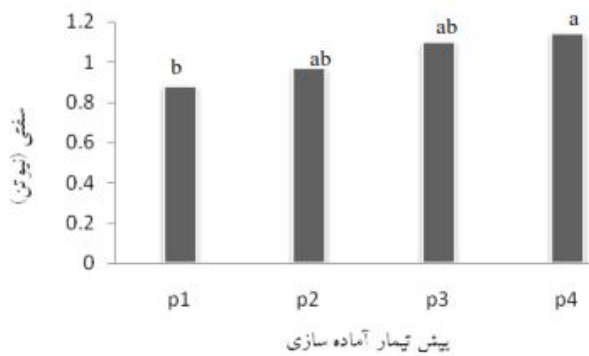
P1 پیش‌تیماز کربنات پتاسیم و روغن سبزه، P2 پیش‌تیماز روغن زیتون، P3 پیش‌تیماز آب داغ، P4 شاهد (بدون پیش‌تیماز آماده‌سازی) (در هر ستون و برای هر فاکتور، میانگین‌های دارای حروف مشترک به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند)

بیشترین مقدار بازجذب آب مربوط به کشمش خشک شده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار بازجذب آب مربوط به کشمش خشک شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. بالا بودن دما یا طولانی شدن زمان خشک کردن در روش‌های متداول خشک کردن با جریان هوا می‌تواند ظرفیت بازجذب آب محصول را کاهش دهد (لین و همکاران، ۱۹۹۸؛ دروزاس و همکاران، ۱۹۹۹). به نظر می‌رسد که بالا بودن مقدار تراکم و چروکیدگی در کشمش خشک

همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است. کمترین سفتی بافت مربوط به کشمش پیش‌تیمار شده با کربنات پتاسیم و روغن سبزه بود و شاهد بیشترین مقدار سفتی بافت را داشت.



شکل ۷- اثر دمای خشک کردن بر سفتی بافت کشمش (میانگین‌های دارای حروف مشترک به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند)



شکل ۸- اثر پیش‌تیمار آماده‌سازی بر سفتی بافت کشمش (P1)

پیش‌تیمار کربنات پتاسیم و روغن سبزه، P2 پیش‌تیمار روغن زیتون، P3 پیش‌تیمار آب داغ، P4 شاهد (بدون پیش‌تیمار آماده‌سازی) (میانگین‌های دارای حروف مشترک به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند))

این نتایج با نتایج بررسی علیزاده بهاباد و همکاران (۲۰۱۰) و اسماعیلی و همکاران (۲۰۰۷) که نشان‌دهنده تأثیر استفاده از پیش-تیمار قلیایی بر کاهش نیروی فشار در آزمون بافت کشمش بود مطابقت دارد. استفاده از امولسیون قلیایی، علاوه بر از بین بردن لایه مومی موجود بر روی پوسته انگور، منجر به ایجاد حفره‌های بسیار ریز در پوسته می‌شود. به علاوه در اثر استفاده از ترکیبات آماده‌سازی، مقاومت مکانیکی پوسته محصول تغییر می‌کند و در نتیجه نیروی لازم برای آزمون بافت و برگشت محصول فشرده شده به حالت اولیه کاهش می‌یابد. اگرچه سفتی بافت کشمش پیش‌تیمار شده با آب داغ بیشتر از کشمش پیش‌تیمار شده با روغن زیتون بود اما نتایج مقایسه میانگین اختلاف معنی‌داری را بین آنها نشان نداد. با توجه به این که سفتی بافت کشمش پیش‌تیمار شده با آب داغ کمتر از سفتی بافت شاهد بود به نظر می‌رسد که استفاده از پیش‌تیمار آب داغ شبکه سلولی را از بین می‌برد و لایه‌های میانی ساختمان میوه را از هم جدا

خشک کردن رخ می‌دهد و منجر به کاهش چروکیدگی در محصول می‌شود (ونگ و برنان، ۱۹۹۵). لذا به نظر می‌رسد که افزایش سرعت خشک شدن و در نتیجه تشکیل پوسته در سطح انگور، هنگام افزایش دمای خشک کردن و استفاده از پیش‌تیمار آماده‌سازی علت کاهش چروکیدگی محصول بوده است. دویماز و کوکاییگیت (۲۰۱۱) بیان نمودند که استفاده از پیش‌تیمارهای اتیل اولئات، اسید سیتریک و حرارت‌دهی، میزان چروکیدگی نخودسبز در طی خشک کردن را کاهش می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که چروکیدگی کشمش تحت تأثیر سرعت هوای خشک‌کننده قرار نگرفته است. عدم تأثیر سرعت هوای خشک‌کننده بر میزان چروکیدگی محصول (ورقه‌های سیبزمینی) توسط یداللهی نیا و جهانگیری (۲۰۰۹) و شکفته و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش شده است.

اثر دما، سرعت هوا و پیش‌تیمار آماده‌سازی بر سفتی بافت کشمش

بافت محصول خشک به عواملی نظیر مقدار رطوبت، ترکیبات، وارپته، میزان رسیدگی میوه، ابعاد نمونه، روش خشک کردن و پیش-تیمارهای آماده‌سازی آن وابسته می‌باشد (رحمان، ۲۰۰۷). نتایج آنالیز واریانس نشان داد دمای خشک کردن و پیش‌تیمار آماده‌سازی به طور معنی‌داری بر سفتی بافت کشمش تأثیر گذاشت ($P \leq 0.01$)، اما اثر سرعت هوا بر سفتی بافت کشمش معنی‌دار نبود (شکل‌های ۷ و ۸). با افزایش دمای خشک کردن، سفتی بافت کشمش افزایش یافت.

طی خشک کردن محصولات بیولوژیکی، حذف آب منجر به تغییر ساختمان سلولی می‌شود. این پدیده با تغییر شکل و ابعاد محصول نیز همراه است. این قبیل تغییرات بر ویژگی‌های فیزیکی محصول تأثیر گذاشته و بافت نهایی محصول خشک شده را تغییر می‌دهند (یان و همکاران، ۲۰۰۷). از آنجا که میزان بازجذب آب نیز یک معیار تعیین میزان تغییرات ساختمانی طی فرایند خشک کردن است و از طرف دیگر نتایج این بررسی نشان می‌دهد که با افزایش دمای هوای خشک‌کننده بازجذب آب کشمش کاهش یافته است، لذا کاهش بازجذب آب و افزایش سفتی بافت کشمش بر تأثیر افزایش دمای خشک کردن بر شدت تغییرات ساختمان سلولی در این محصول دلالت دارد. خشک کردن کند محصول که با استفاده از دمای پایین، سرعت هوای کم و رطوبت نسبی بالای هوای خشک کردن انجام می‌شود، به تولید محصولاتی یکنواخت و متراکم منجر می‌گردد (برنان، ۱۹۹۴)، از طرف دیگر استفاده از سرعت‌های بالای خشک کردن، تراکم بافت محصولات غذایی را کاهش داده و محصولاتی سفت‌تر دارای یک پوسته در سطح را تولید می‌کند (پوتر و هتچکس، ۱۹۹۸). تأثیر دمای هوای خشک‌کننده بر مقدار نیروی لازم در آزمون فشار محصول خشک شده با جریان هوای داغ توسط بونداروک و

هوای و پیش تیمار آماده سازی قرار گرفت ($P \leq 0.01$) (جدول ۲). اثر متقابل دمای خشک کردن و پیش تیمار آماده سازی نیز بر شاخص قهوه ای شدن معنی دار بود. افزایش دمای خشک کردن با افزایش شاخص قهوه ای شدن همراه بود. با توجه به تاثیر دما بر شدت واکنش های قهوه ای شدن، افزایش شاخص قهوه ای شدن کشمش با افزایش دمای هوای خشک کننده دور از انتظار نیست. از عواملی که سبب کاهش قهوه ای شدن غیرآزمی در طول دوره خشک شدن محصول می گردد می توان به عدم به کارگیری دماهای بالا در زمانی که محصول دارای رطوبت بحرانی است، اشاره کرد (اکس، ۱۹۸۹). افزایش شدت قهوه ای شدن با افزایش دمای هوای خشک کردن برای جنسینگ (رن و چن، ۱۹۹۸) و حبه های سیر (شارما و پرساد، ۲۰۰۱) نیز گزارش شده است. افزایش سرعت هوا، شاخص قهوه ای شدن را کاهش داد. افزایش سرعت خروج آب و در نتیجه کاهش زمان خشک کردن با افزایش سرعت هوا می تواند دلیل این مسئله باشد. استفاده از پیش تیمار آماده سازی کربنات پتاسیم و روغن سبزه و شدن گردید، اگرچه نتایج مقایسه میانگین اختلاف معنی داری را بین شاخص قهوه ای شدن مربوط به این دو پیش تیمار نشان نداد. با توجه به اینکه مطالعات نشان داده است که استفاده از پیش تیمار نه تنها زمان خشک شدن را کاهش می دهد بلکه بر پارامترهای اصلی تشکیل رنگ نیز تاثیر می گذارد به طوری که ترکیبات قلیایی از واکنش پلی- فنیل ممانت می کنند و محلول های آماده سازی حاوی روغن نیز زمان خشک کردن را کاهش داده و باعث بهبود رنگ محصول نهایی می شوند (اسماعیلی و همکاران، ۲۰۰۷؛ سیمال و همکاران، ۱۹۹۶؛ مهموتگلو و همکاران، ۱۹۹۶؛ علیزاده بهاباد و همکاران، ۲۰۱۰) این نتایج دور از انتظار نیست. استفاده از پیش تیمار آب داغ، افزایش شاخص قهوه ای شدن را به دنبال داشت. به نظر می رسد که تغییر رنگ (قهوه ای شدن) سریع انگور پس از انجام پیش تیمار آماده سازی آب داغ، افزایش شاخص قهوه ای در انگور خشک شده را نیز به دنبال داشته است. اسماعیلی و همکاران (۲۰۰۷) گزارش نمودند که کشمش پیش تیمار شده با محلول قلیایی نسبت به نمونه های پیش تیمار شده با آب داغ و سایر محلول های آماده سازی رنگ روشن تری داشت. نتایج بررسی پهلوان زاده و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد که استفاده از پیش تیمار کربنات پتاسیم سبب روشن تر شدن رنگ کشمش نسبت به شاهد می شود.

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر بر تاثیر فاکتورهای دما، سرعت هوای خشک کننده و پیش تیمار آماده سازی بر شدت خشک شدن انگور و ویژگی های کیفی کشمش دلالت داشت.

می کند و در نتیجه سبب نرم شدن بافت محصول نهایی و کاهش سفتی می شود. چنین نتیجه ای هنگام استفاده از پیش تیمار آنزیم بری در خشک کردن کیوی توسط گرشسون و همکاران (۲۰۰۱) نیز گزارش شده است. نتایج آنالیز واریانس همچنین نشان داد که هیچ یک از اثرات متقابل فاکتورهای مورد بررسی بر سفتی بافت کشمش معنی دار نبوده است.

اثر دما، سرعت هوا و پیش تیمار آماده سازی بر شاخص قهوه ای شدن کشمش

رنگ یک ویژگی مهم کیفی مواد غذایی و محصولات کشاورزی است به طوری که تغییرات نامطلوب این ویژگی، می تواند سبب کاهش کیفیت و بازارپسندی محصول شود. بالابودن دما یا طولانی شدن زمان خشک کردن در روش های متداول خشک کردن با جریان هوا می تواند به شدت به رنگ محصول صدمه بزند (لین و همکاران، ۱۹۹۸؛ دروزاس و همکاران، ۱۹۹۹). رنگ نامطلوب در خشکبار به دلیل واکنش های قهوه ای شدن ایجاد می شود. عواملی نظیر رطوبت، دما، pH و ترکیبات ماده غذایی سبب تسریع واکنش های قهوه ای شدن غیرآزمی می لارد می شوند. سرعت قهوه ای شدن معمولا در محدوده محتوای رطوبت میانی در حداکثر ممکن بوده و با افزایش یا کاهش زیاد این رطوبت میزان قهوه ای شدن کاهش خواهد یافت (قنبرزاده، ۱۳۸۴).

جدول ۲- اثر دمای خشک کردن، سرعت هوا و پیش تیمار آماده سازی بر شاخص قهوه ای شدن

فاکتور	سطح	شاخص قهوه ای شدن
دما (درجه سانتی گراد)	۶۰	۰/۱۵۷ ^c
	۷۰	۰/۲۰۵ ^b
	۸۰	۰/۲۹۹ ^a
سرعت هوا (متر بر ثانیه)	۱/۵	۰/۲۲۵ ^a
	۲/۵	۰/۲۱۶ ^b
پیش تیمار آماده سازی	P1	۰/۱۸۲ ^c
	P2	۰/۱۸۳ ^c
	P3	۰/۲۶۳ ^a
	P4	۰/۲۵۵ ^b

P1 پیش تیمار کربنات پتاسیم و روغن سبزه، P2 پیش تیمار روغن زیتون، P3 پیش تیمار آب داغ، P4 شاهد (بدون پیش تیمار آماده سازی) (برای هر فاکتور، میانگین های دارای حروف مشترک به لحاظ آماری اختلاف معنی داری ندارند)

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که شاخص قهوه ای شدن کشمش به طور معنی داری تحت تاثیر فاکتورهای دمای خشک کردن، سرعت

فیزیکوشیمیایی کشمش نشان داد که در بین شرایط مختلف مورد مطالعه برای خشک کردن انگور، پیش‌تیمار کربنات پتاسیم و روغن سبزه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان هوای ۲/۵ متر بر ثانیه شرایط مطلوبتری بوده است.

قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد و شرکت شهرک‌های صنعتی خراسان رضوی برای کمک‌های مالی و فراهم نمودن امکانات انجام تحقیق قدردانی می‌شود.

افزایش دما و سرعت هوای خشک‌کننده و نیز استفاده از پیش- تیمار آماده‌سازی موجب افزایش شدت خشک شدن انگور شد. استفاده از دمای هوای خشک‌کننده ۶۰ درجه سانتی‌گراد، مطلوب‌ترین مقادیر بافت، چروکیدگی و کمترین شاخص قهوه‌ای شدن را به دنبال داشت و بیشترین مقدار بازجذب آب مربوط به کشمش خشک شده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. سرعت جریان هوای خشک‌کننده تنها بر شاخص قهوه‌ای شدن تاثیر معنی‌داری گذاشت. افزایش سرعت جریان هوا، کاهش شاخص قهوه‌ای شدن را سبب شد. در بین پیش‌تیمارهای به کار رفته، نتایج فیزیکوشیمیایی بهتر، مربوط به پیش‌تیمار کربنات پتاسیم و روغن سبزه بود. به طور کلی مقایسه ویژگی‌های

منابع

- Aguilera, J.M., and Stanley, D.W. 1999. Micro structural principles of food processing and engineering (2nd ed.). Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Alizadeh Bahaabad, G., Esmaili, M., Alizadeh, M., and Gharibzahedi, S.M.T. 2010. Effect of Grape Chemical Pretreatment and its Storage Conditions on the Texture Properties of Raisin. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 8 (2): 141-145.
- Al-Khuseibi, M.K., Sablani, S.S., and Perera, C.O. 2005. Comparison of water blanching and high hydrostatic pressure effects on drying kinetics and quality of potato. *Drying Technology*, 23: 2449-2461.
- Alvarez, C.A., Aguerre, R., Gomez, S., Vidales, S., Alzamora, S.M., and Gerschenson, L.N. 1994. Effect of blanching and glucosedipping pre-treatment on air-drying behavior of strawberries. In Argai, A., Lopez-Malo, A., Palou, E., and Corte, P. Symposium on the properties of water Proceedings of the poster session (pp. 11-14). *Mexico: Universidad de los Americas*.
- Baloch, A.K., and Edward, R.A. 1973. Measurement of non enzymatic browning of dehydrated carrot. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24: 389-398.
- Barbosa-candvas, G., and Vega-Mercado, H. 1996. Dehydration of food. Champ & Hall, New York, N.Y.
- Bondaruk, J., Markowski, M., and Błaszczak, W. 2007. Effect of drying conditions on the quality of vacuum-microwave dried potato cubes. *Journal of Food Engineering*, 81: 306-312.
- Brennan, J.G. 1994. Food dehydration: a dictionary and guide. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Canovas, V.G., and Mercado, H.V. 1996. Dehydration of Food. Chapman and Hall Publishers. New York, U.S.A
- Crapiste, G.H. 2000. Simulation of drying rates and quality changes during dehydration of foodstuffs. In J. E. Lozano, M. C. An, E. Parada Arias, & G. V. Barbosa-Candvas (Eds.), *Trends in food engineering* (pp. 135-148). Technomic Publishing Co., Inc.
- Dimatteo, M., Cinquanta, L., Galiero, G., Crescitelli, S. 2000. Effect of a novel physical pretreatment process on drying kinetics of seedless grapes. *Journal of Food Engineering*, 46 (2): 83-9.
- Doymaz, I. 2008. Convective drying kinetics of strawberry. *Chemical Engineering Process*. 47: 914-919.
- Doymaz, I and Altiner, P. 2012. Effect of pretreatment solution on drying and color characteristics of seedless grapes. *Food Science and Biotechnology*, 21 (1): 43-49.
- Doymaz, I., and Kocayigit, F. 2011. Drying and Rehydration Behaviours of Convection Drying of Green Peas. *Drying Technology*, 29 (11): 1273-1282.
- Drouzas, A.E., Tsami, E., and Saravacos, G.D. 1999. Microwave vacuum drying of model fruits gels. *Journal of Food Engineering*, 63: 679-683.
- Eissen, W., Muehlbauer, W., and Kutzbach, H.D. 1985. Solar drying of grape. *Drying Technology*, 3(1): 63-74.
- Esmaili, M., Sotudeh-gharebagh, R., Cronin, K.E., Mousavi, M.A., and Rezazadeh, A. 2007. Grape drying, A Review. *Food Reviews International*, 23: 257-280.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), FAOSTAT Database, <http://apps.fao.org/>. 2012.
- Gerschenson, L.N., Rojas, A.M., and Marangoni, A.G. 2001. Effect of processing on kiwi fruit dynamic rheological behaviour and tissue structure. *Food Research International*, 34: 1-6.
- Ghasemzadeh, R., Karbassi, A., and Ghoddousi, H.B. 2008. Application of Edible Coating for Improvement of Quality and Shelf-life of Raisins. *World Applied Sciences Journal*, 3 (1): 82-87.
- Ghanbarzadeh, B. 2005. Principles of food chemistry. *Ayeej publications*.
- Gholami, M., Rashidi, M. 2009. Influence of temperature, air velocity and pretreatments on drying of black currant

- grape. *Journal of Food Science and Technology*, 6: 2, 13- 22.
- Institute of Standard and Industrial Research of Iran. 2015. Dry fruits –determination of the moisture content-test methods. ISIRI Number 672.
- Jalili Marandi, R. 2005. Small fruits (grape, strawberry, kiwi fruit, raspberry...). Jahad Daneshgahi Orumieh publications.
- Kaymak-Ertekin, F. 2002. Drying and rehydrating kinetics of green and red peppers. *Journal of Food Science*, 67 (1): 168–175.
- Kerdpi boon, S., Kerr, W.L., and Devahastin, S .2006. Neural network prediction of physical property changes of dried carrot as a function of fractal dimension and moisture content. *Food Research International*, 39: 1110–1118.
- Lin, T.M., Durance, T.D., and Scaman, C.H. 1998. A Characterisation of vacuum microwave air and freeze dried carrots slices. *Food Research International*, 4: 111 –117.
- Maghsoudi, S. 2008. The technology of grape and its products. Elm Keshavarzi Iran publications.
- Mahmutoglo, T., Emir, F., and Saygi, Y.B. 1996. Sun/Solar drying of differently treated grapes and storage stability of dried grapes. *Journal of Food Engineering*, 29: 289-300.
- Marques, L., Prado, M., and Freire, J. 2009. Rehydration characteristics of freeze-dried tropical fruits. *LWT Food Science and Technology*, 42 (7): 1232–1237.
- Mayor, L., and Sereno, A.M. 2004. Modeling shrinkage during convective drying of food materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 61: 373–386.
- McLellan, M.R., Kime, R.W., Lee, C.Y., and Long, T.M. 1995. Effect of honey as anti browning agent in light raisin processing. *Journal of food processing and preservation*, 19(1): 1-8.
- Okos, M.R. 1989. Design and control of energy efficient food drying processes with specific Reference to quality. Report Purdue University, Indiana.
- Pahlavanzadeh, H., Basiri, A., and Zarrabi, M. 2002. Grape drying. *scientia Iranica*, 9 (1): 66-70.
- Pangavhane, D.R., Sawheny, R.L., and Saravardia, P.N. 1999. Effect of various dipping pretreatments on drying kinetics of Thompson seedless grapes. *Journal of Food Engineering*, 39(2): 211-216.
- Parin, H. 2004. Effect of pretreatment and air temperature on the dry rate, rehydration capacity and color of artichoke. MSc Thesis. The graduate school of natural and applied science of Middle East Technical University.
- Ponting, J.D., and McBean, D.M. 1970. Temperature and dipping treatment effect on drying rates and drying times of grapes, prunes and other waxy fruits. *Food Technology*, 24: 1403-1406.
- Potter, N.N., and Hotchkiss, J.H. 1998. Food dehydration and concentration. *In Food science* (5th ed., pp. 200–244). Maryland: Aspen Publishers.
- Rahman, M.S. 2007. Handbook of food preservation. 2nd ed. CRC press: 408-409.
- Ren, G., and Chen, F. 1998. Drying of American Ginseng Roots by Microwave-hot Air Combination. *Journal of Food Engineering*, 35 (4): 433- 443.
- Rolle, L., Giordano, M., Giacosa, S., Vincenzi, S., Segadea, S.R., Torchio, F., Perrone, B., and Gerbi, V. 2012. CIEL*a*b* parameters of white dehydrated grapes as quality markers according to chemical composition, volatile profile and mechanical properties. *Analytica Chimica Acta*, 732: 105-113.
- Senadeera, W., Bhandari, B., Young, G., and Wijesinghe, B. 2000. Physical property changes of fruits and vegetables during hot air drying. In A. S. Mujumdar (Ed.), *Drying technology in agriculture and food sciences* (pp. 149–166). Enfield (NH), USA: Science Publishers, Inc.
- Shafafi Zenoosian, M. 2007. Use of artificial neural network and image processing to modeling and analyzing of pumpkin dry processing by combined osmo- air drying method. *PhD Thesis*, Ferdowsi University of Mashhad.
- Shanmugavelu, K.G. 2003. Grape cultivation and processing. Agrobios (India) press.
- Sharma, G.P., and Prasad, S. 2001. Drying of Garlic (*Allium sativum*) Cloves by Microwave-hot Air Combination. *Journal of Food Engineering*, 50 (2): 99-105.
- Shekofteh, M., Eskandari Cherati, F., Kamyab, S., and Hosseinpor, Y. 2012. Study of Shrinkage of Potato Sheets during Drying in Thin-Layer Dryer. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 4 (16): 2677-2681.
- Simal, S., Rossello, C., Sanchez, E., and Canellas, J. 1996. Quality of raisins treated and stored under different conditions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3297-3302.
- Toosi, M. 2009. Study of internal and external market of raisin (problems and solutions). ***Agricultural Planning Economic and rural Development Research Institute.***
- Vazquez, G., Chenlo, R., and Costoyas, A. 2000. Effect of various treatments on the drying kinetics of Muscatel grape. *Drying Technology*, 18(9): 2131-2144.
- Vega-Glvez, A., Scala, K.D., Rodriguez, K., and Lemus-Mondaca, R. 2009. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, anti oxidant capacity, color and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*, 117: 647–653.

- Wang, N., and Brennan, J.G. 1995. Changes in structure, density and porosity of potato during dehydration. *Journal of Food Engineering*, 24: 61-76.
- Xiao, H.W., Pang, C.L., Wan, L.H., Bai, J.W., Yang, W.X., and Gao, Z.J. 2010. Drying kinetics and quality of Monukka seedless grapes dried in an air-impingement jet dryer. *biosystems engineering*, 105: 233-240.
- Yadollahinia, A., and Jahangiri, M. 2009. Shrinkage of potato slices during drying. *Journal of Food Engineering*, 94: 52-58.
- Yan, Z., Sousa-Gallagher, J.M., and Oliveira, A.R.F. 2007. Shrinkage and porosity of banana, pineapple and mango slices during air-drying. *Journal of Food Engineering*, 83 (3): 430-440.
- Zarrabi, M. 1998. Determination of planning parameters in grape drying. MSc. Thesis, Tarbiat Modares University of Tehran.

Investigation the effect of cabinet drying conditions and different pretreatments on drying rate of grape and quality of raisin

A. Ayoubi¹, N. Sedaghat^{*2}, M. Kashaninejad³, M. Mohebbi⁴, M. Nassiri Mahalati⁵

Received: 2014.02.11

Accepted: 2014.09.09

Introduction: Raisin is ripped and dried form of grape. Drying is one of the most important steps in raisin processing. Achieving optimum drying conditions can affect the processing time and improvement of raisin quality. Temperature, air velocity and pretreatment are important factors in grape drying process and its quality. One of the most important physical changes that the food suffers during drying is the reduction of its external volume. Loss of water and heating cause stresses in the cellular structure of the food leading to change in shape and decrease in dimension. Water movement and other solute materials influence the texture characteristics. Changes in shape, loss of volume and increased hardness cause in most cases a negative impression in the consumer. There are, on the other hand, some dried products that have had traditionally a shrunken aspect, a requirement for the consumer of raisins or dried apricots. The purpose of this research was study effect of drying conditions (drying air temperature, air velocity and pretreatments) on drying grape process and quality of raisin

Materials and method:

Materials:

Grape (cv Askari) prepared from Kashmar gardens. Harvested samples have been kept at 4 °C. After measuring moisture, diameter and Brix, the safe seeds are separated from their cluster. In order to pretreatment process grapes are dipped into the following solutions:

- aqueous solution of potassium carbonate (2.5% w/w), and 2% Paksan oil
- aqueous solution of 2% olive oil
- hot water
- distilled water (control)

Experiments were performed at air temperatures of 60, 70 and 80 °C and air velocities of 1.5 and 2.5 m. s⁻¹. A batch cabinet dryer containing three perforated trays was used for drying the samples. The thermal condition was variable and the operational temperature could be tuned with a built-in thermocouple. The grapes were put on the tray in single layer after pre-treatment. Drying process continued to reduce the moisture content of the grape samples to 13% (wet basis). After drying process the raisin samples were packaged in a 3 laminated layer bags (PE/PA/PE) and kept at temperature 4 °C. The dried sample was analyzed for its quality by estimating the rehydration, shrinkage, hardness and browning index. To calculate the drying rate at any time of the drying process, the sample weight at the time and the next time were measured. Shrinkage was determined from the change in volume of raisin prior and after drying. Rehydration properties were determined by immersing dried samples in boiling water (100 °C) for 10 min. Browning index was measured in according to the method developed by Baloch et al. Extraction of the water soluble brown pigment was carried out with acetic acid containing formaldehyde. Absorbance of supernatants was recorded at 420 and 600 nm, using an UV-VIS double-beam spectrophotometer (S2000 uv/vis light wave). The browning index was calculated by subtracting absorbance at 600 nm (for turbidity) from that of 420 nm. Hardness of raisins was determined in a puncture test

1-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

2 and 4- Associated Professor and Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3-Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture Science and Natural Resources university of Gorgan, Gorgan, , Iran.

5- Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(*Corresponding author: sedaghat1@yahoo.com)

using a QTS texture analyzer (CNS Farnell, Essex, UK) equipped with a needle probe (stainless steel cylinder of 2 mm of diameter with a conical needle bit) and a test speed of $60 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ during the test. Hardness was defined as maximum force to puncture raisin from the top to a 2mm depth. Analysis of variance (ANOVA) was conducted for data using MSTAT-C software. Differences among the mean values were also determined using Duncan's Multiple Range test. A significant level was defined as a probability of 0.05.

Results and Discussion: The results showed that temperature, air velocity and pretreatment have significant effects on drying rate and quality of raisin. Drying rate increased with increasing temperature, air velocity and with application of pretreatment. The waxy cuticle of grape skin controls the rate of moisture diffusion through the berries and, in order to accelerate drying, chemical treatments are applied to remove or modify this cuticle and increase grape skin permeability to water. The results showed that pretreatment of potassium carbonate and Paksan oil had most effect in accelerating drying process. Rehydration depends on structural changes in vegetal tissues and cells of food material during drying, which produces shrinkage, collapse and reduces the water absorption capacity, thereby preventing the complete rehydration of the dried product. The pretreated grapes showed increased rehydration. Increasing temperature and application of pretreatment caused a reduction in shrinkage. It was found that increasing drying temperature increased the hardness of raisin and treating the grape caused reducing the hardness of raisin. Increasing drying temperature resulted in higher browning index. The treated grape by potassium carbonate and Paksan oil had least browning index. Increasing air velocity decreased browning index. The best values of hardness (0.73 N), shrinkage (81/04%) and the least value of browning index (0/157) were related to dried raisin at $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and most value of rehydration (1/266) was related to dried raisin at $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Air velocity just significantly affected on browning index. Also between used pretreatments, potassium carbonate and paksan oil caused best physicochemical results.

Keywords: Air velocity, Drying, Drying rate, Hardness, Raisin, Shrinkage.

پایداری اکسایشی تری آسیل گلیسرول روغن ماهی کیلکا

(*Clupeonella cultiventris caspia*) تحت تأثیر روغنهای مغز و پوست بنه و اجزاء

صابونی‌ناشونده آنها

سمانه پژوهان‌مهر^۱، رضا فرهوش^{۲*}، رضا اسماعیل‌زاده کناری^۳، علی شریف^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۲۴

چکیده

در این تحقیق، پایداری اکسایشی روغن تخلیص شده ماهی کیلکا (*Clupeonella cultiventris caspia*) در حضور روغن‌های مغز و پوست بنه (۱-۲) درصد وزنی/وزنی و اجزاء صابونی‌ناشونده آنها (۱/۵-۱ درصد وزنی/وزنی) بررسی و با اثر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی رایج نظیر آلفاتوکوفرول و بوتیل‌هیدروکسی‌تولون (BHT) (۱۰۰ پی‌پی‌ام) با استفاده از روش رنسیمیت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مقایسه شد. تغییرات شاخص پایداری اکسایشی نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (OSI_{۶۰}، ساعت) بعنوان معیار سنجش پایداری اکسایشی در نظر گرفته شد. نتایج بر اساس داده‌های شاخص پلی‌ان و میزان ترکیبات صابونی‌ناشونده، توکوفرولی، فنلی و استرولی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اجزاء تشکیل دهنده ترکیبات صابونی‌ناشونده روغن‌های مغز و پوست شناسایی و تعیین مقدار شدند. بیشترین میزان اجزاء تشکیل دهنده مواد صابونی‌ناشونده مغز و پوست بنه به ترکیبات توکوفرولی و توکوتری انولی تعلق داشت. OSI_{۶۰} نمونه‌های شاهد (۱/۶۶ ساعت) در حضور کلیه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. به طور کلی ترکیبات صابونی‌ناشونده مغز بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد، بطوری که OSI_{۶۰} در حضور غلظت ۱/۵ درصد از این ترکیب تا ۸/۱۲ برابر افزایش یافت (OSI_{۶۰} برابر با ۱۳/۴۸ ساعت) ($p < 0.05$).

واژه‌های کلیدی: پایداری اکسایشی، تری آسیل گلیسرول، روغن بنه، کیلکا، اجزاء صابونی‌ناشونده

مقدمه

طرفی این ساختار اسید چربی سبب افزایش قابلیت اکسایش و فسادپذیری روغن ماهی می‌شود و به دلیل تولید ترکیبات نامطلوب، موجبات کاهش کیفیت و ارزش غذایی آن را فراهم می‌آورد (Wanasundara and Shahidi, 1998).

ماهی کیلکا از جمله منابع ارزشمند روغن ماهی و از فراوان‌ترین گونه‌های مهم شیلاتی دریای خزر بشمار می‌رود. گونه‌های کیلکای دریای خزر به جنس *Clupeonella* تعلق دارند و سه گونه‌ی عمده این جنس عبارت از کیلکای معمولی (*C. delicatula*)، کیلکای آنچوی (*C. engrauliformis*) و کیلکای چشم‌درشت (*C. grimmii*) می‌باشند (Fazli et al., 2009). استخراج روغن ماهی کیلکا با روش بلای و دایر^۸ مقدار روغن این ماهی را ۶/۶۳ درصد نشان داده است (هنری، ۱۳۸۳). در میان سه گونه مزبور، کیلکای معمولی دریای خزر از اهمیت صنعتی و اقتصادی بالاتری برخوردار می‌باشد. مقادیر اسیدهای چرب چند غیراشباع و امگا ۳ در روغن گونه معمولی به ترتیب ۱۹/۴۳ و ۱۶/۸۱ درصد گزارش شده‌اند (Pirestani et al.,

روغن ماهی به عنوان منبعی غنی از اسیدهای چرب ضروری چند غیراشباع^۵ (بویژه امگا ۳ نظیر DHA^۶ و EPA^۷ و امگا ۶) و ویتامین‌های A و D، و یکی از بهترین منابع غذایی و دارویی به شمار می‌رود (Connor, 2000; Pirestani et al., 2010). ساختار اسید چرب این روغن و خواص دارویی آن در کاهش فشار خون، افزایش قدرت حافظه، تقویت سیستم ایمنی، جلوگیری از آلزایمر و شب‌کوری، درمان انواع سرطان و بیماری‌های قلبی، پوستی و چشم سبب انتخاب این روغن در جیره غذایی هفتگی افراد شده است. از

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ساری

* - نویسنده مسئول: Email: rfarhoosh@um.ac.ir

5 Poly Unsaturated Fatty Acid (PUFA)
6 Docosahexaenoic Acid
7 Eicosapentaenoic Acid

(BHA)^۵ می‌باشند (Warner *et al.*, 1986). بررسی‌های انجام شده شده حاکی از آن است که برخی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی دارای آثار فیزیولوژیکی نامطلوب در بدن انسان می‌باشند. بنابراین بمنظور کاهش و یا جلوگیری از مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مواد غذایی و نیز تمایل مصرف‌کنندگان به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ایمن، استفاده از ترکیبات طبیعی بخصوص طی دو دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Namiki, 1990). متداولترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی عبارت از مشتقات اسید سینامیک، اسیدهای آمینه، پیتیدها، اسیدهای آلی چند عاملی، توکوفرولها و فلاونوئیدها می‌باشند (Pratt, 1992; Matthaus, 2002; Cheng *et al.*, 2003). اجزاء مواد صابونی ناشونده (USM)^۶ روغن‌های گیاهی متشکل از هیدروکربن‌ها، الکل‌های تریپنی، توکوفرول‌ها، استرول‌ها و برخی ترکیبات فنلی نیز در بهبود پایداری اکسایشی روغنهای گیاهی تأثیرگذار بوده و بطور معمول ۰/۵ تا ۲/۵ درصد از روغن‌ها را تشکیل می‌دهند. با وجود این، برخی روغن‌ها دارای مقادیر بیشتری (حدود ۵ تا ۶ درصد) از مواد صابونی ناشونده می‌باشند. (Sims *et al.*, 1972; Bosku and Morton, 1976).

بنه (*Pistacia atlantica*) از انواع پسته وحشی رایج در ایران و منبعی غنی از آنتی‌اکسیدانهای طبیعی است. سه گونه رایج آن عبارت از موتیکا (*mutica*)، کردیکا (*kurdica*) و کابولیکا (*cabulica*) هستند که گونه اول در ایران شناخته شده‌تر و گسترده‌تر (بیش از ۹۰ درصد) است. بنه در مناطق مختلف ایران در استانهای سیستان و بلوچستان، خراسان و کرمان به صورت پراکنده و در نیمه غربی کشور بویژه استانهای فارس، کردستان، ایلام و کرمانشاه به صورت انبوه دیده می‌شود. وسعت درختان بنه در ایران بیش از یک میلیون و دویست هزار هکتار است (توکلی و همکاران، ۱۳۸۷). بررسی‌های انجام شده در خصوص مقدار روغن موجود در مغز و پوست بنه نشان داده است مغز و پوست بنه به ترتیب حاوی حدود ۵۶ و ۴۰ درصد روغن با پایداری اکسایشی بسیار بالا می‌باشند. بالا بودن پایداری اکسایشی روغن پوست و مغز بنه و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها در روغنهای گیاهی (نظیر کانولا و آفتابگردان) تا حد زیادی ناشی از وجود مقادیر قابل توجه ترکیبات توکوفرولی و فنولی در این منابع روغنی است. مقدار ترکیبات توکوفرولی روغن مغز و پوست بنه گونه موتیکا به ترتیب ۸۱۸/۵۸ و ۵۷۳ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در کیلوگرم روغن و مقدار ترکیبات فنولی آنها به ترتیب ۸۱/۱۲ و ۲۷۷ میلی‌گرم اسید گالیک در کیلوگرم روغن گزارش شده است (Sharif *et al.*, 2009; Farhoosh *et al.*, 2008; Sharayei *et al.*, 2011a). طرفی بررسی‌ها نشان داده است اثر اجزای صابونی ناشونده روغنهای

(2010; Fazel *et al.*, 2008). همچنین بررسی‌های صورت گرفته نشان داده است روغن ماهی کیلکای معمولی نسبت به روغن سایر ماهیان دریای خزر دارای نسبت امگا ۳ به امگا ۶ بیشتری است و به این ترتیب از ارزش غذایی بالاتری نیز برخوردار می‌باشد (Pirestani *et al.*, 2010). مقادیر نسبت اسیدهای چرب امگا ۳ به امگا ۶ روغن‌های ماهی به عنوان شاخصی مناسب برای مقایسه ارزش تغذیه‌ای آنها در نظر گرفته شده است (Piggott and Tucker, 1990)؛ به طوری که نسبتی معادل حداقل ۱ تا ۵ نشان دهنده بالا بودن کیفیت تغذیه‌ای این روغن‌هاست (Osman *et al.*, 2001). از این رو روغن ماهی کیلکای معمولی با نسبتی معادل ۶/۴۲ به عنوان منبع تغذیه‌ای ارزشمند مورد توجه بوده است، تا آنجا که حتی در مقایسه با روغن ماهی‌های ارزشمند (از نظر اقتصادی) مدیترانه‌ای نظیر *black goby (Gobius niger)*، *picarel (Spicara smaris)* و *salema (Sarpa salpa)* (نسبتهای امگا ۳ به امگا ۶ به ترتیب معادل ۲/۴۶، ۴/۴۰ و ۵/۵۸) نیز در مقام بالاتری قرار گرفته است (Pirestani *et al.*, 2010; Prato and Biandolino, 2012). در نظر گرفتن شاخص پلی آن ۱ بعنوان شاخص اکسایش پذیری روغن ماهی نشان داده است روغن ماهی کیلکای معمولی در بین مهمترین گونه‌های جنوب دریای خزر نظیر *pike perch (Sander lucioperca)* و *common carp (Caprinus carpio)* و *golden gray mullet (Liza aurata)* (به ترتیب ۰/۶۵، ۰/۵۷، ۰/۵۲ و ۰/۴۱) بیشتر مقدار این شاخص را (به ترتیب ۰/۶۵، ۰/۵۷، ۰/۵۲ و ۰/۴۱) می‌دهد (Pirestani *et al.*, 2010). علی‌رغم افزایش سالانه صید ماهی کیلکا از دریاهای کشور، به دلیل بالا بودن قابلیت اکسایش روغن این ماهی و نیز فساد و گسترش بدطعمی در آن، مصارف مفید روغن این ماهی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. همچنین به رغم بالا بودن خواص تغذیه‌ای و دارویی روغن ماهی کیلکا تاکنون تحقیق جامعی در زمینه تولید روغن خوراکی از این ماهی و افزایش کیفیت روغن آن برای مصارف انسانی در کشور انجام نشده است و بررسی‌های صورت گرفته طی سالهای اخیر صرفاً به تولید پودر ماهی برای خوراک آبزیان و کنسرو ماهی کیلکا اختصاص داشته است.

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به قصد افزایش پایداری اکسایشی روغن ماهی، راهکار مناسبی برای بهبود کیفیت آن محسوب می‌گردد. در حال حاضر، آنتی‌اکسیدانهای سنتزی مجاز در فرآورده‌های غذایی شامل ترسیوبوتیل هیدروکینون (TBHQ)^۲، پروپیل گالات (PG)^۳، هیدروکسی تولوئن بوتیل (BHT)^۴ و هیدروکسی آنیزول بوتیل

1 Polyene index: (EPA+DHA)/C16:0

2 Tert- Butylhydroquinone

3 Propyl gallate

4 Butylated hydroxytoluene

5 Butylated hydroxyanisole

6 Unsaponifiable matters

تولید تری آسیل گلیسرول خالص^۱ (PKO)، تخلیص روغن ماهی کیلکا با استفاده از کروماتوگرافی ستونی چندلایه‌ای (آلومینا-سیلیکاژل) به همراه اصلاحاتی در روش Belhaj و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت. آلومینا و سیلیکاژل پیش از استفاده به مدت ۳ ساعت به ترتیب در دماهای ۲۰۰ و ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد فعال شدند. انتهای ستون شیشه‌ای کروماتوگرافی با قطر داخلی ۳ سانتی‌متر و طول ۴۰ سانتی‌متر به ارلن بوخنر متصل به خلا وصل شد. پس از پر کردن یکنواخت ستون به ترتیب با پنجاه گرم آلومینا (نوع ۶۰ فعال خنثی) و ۸۰ گرم سیلیکاژل (۶۰ تا ۲۰۰ مش)، صد گرم روغن خام ماهی کیلکا بدون نیاز به حلال از ستون عبور داده شد. برای اطمینان از حذف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، روغن حاصل دوباره از ستون پر شده با آلومینا و سیلیکاژل تازه عبور داده شد و مقادیر عدد پراکسید، توکوفرول کل و پلی‌فنل کل نیز بعد از هر مرحله تخلیص اندازه گیری گردید. اطراف ستون و ارلن بوخنر با ورقه آلومینیومی پوشانیده شد تا از اکسایش نوری روغن جلوگیری به عمل آید.

ساختار اسید چربی

بمنظور تعیین ساختار اسیدچربی روغن‌های مغز و پوست بنه، محلولی از ۰/۳ گرم نمونه روغن در ۷ میلی‌لیتر هگزان نرمال با ۲ میلی‌لیتر پتاس متانولی ۷ نرمال به مدت ۱۰ دقیق در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بشدت هم زده شد تا اسیدهای چرب نمونه روغن به استرهای متیل مربوطه تبدیل شوند. استرهای متیل با دستگاه کروماتوگراف^۲ مجهز به ستون موئینه^۳ و آشکارساز یونیزه کننده شعله‌ای^۴ (FID) تعیین مقدار شدند (درصد). ازت با سرعت جریان ۰/۷۵ میلی‌لیتر بر دقیقه بعنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت. دمای اون ۱۹۸ درجه سانتی‌گراد و دمای بخشهای تزریق نمونه و آشکارساز ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود (Farhoosh et al., 2008a). تعیین ساختار اسید چربی روغن ماهی کیلکا نیز به روش Sharina و Jummat (۲۰۰۶) صورت گرفت.

استخراج مواد صابونی ناشونده و جداسازی اجزاء آن

مواد صابونی ناشونده روغن‌ها بر اساس روش Lozano و همکاران (۱۹۹۳) استخراج و تعیین مقدار شد. جداسازی اجزاء تشکیل دهنده ترکیبات صابونی ناشونده روغن‌های مغز و پوست بنه با استفاده از

مغز و پوست بنه در افزایش بایداری اکسایشی روغن‌های گیاهی ناشی از وجود فراکسیون‌های فعال آنتی‌اکسیدانی نظیر الکلهای تریپنی، استرول‌ها و توکوفرول‌ها در این اجزاء می‌باشد (Farhoosh and Tavassoli Kafrani, 2011; Farhoosh et al., 2011a,b; Sharayei et al., 2011b; Farhoosh et al., 2012).

با توجه به ارزش غذایی و دارویی روغن ماهی کیلکا و نیز بمنظور استفاده بهینه از این منبع غنی و با ارزش، تولید این روغن برای مصارف انسانی و بهبود کیفیت آن از جمله اهداف صنایع غذایی و دارویی به شمار می‌رود. بعلاوه براساس خاصیت آنتی‌اکسیدانی روغن‌های مغز و پوست بنه و اجزاء صابونی ناشونده آنها در روغن‌های گیاهی انتظار می‌رود این منابع آنتی‌اکسیدانی طبیعی به طرز قابل توجهی سبب افزایش بایداری اکسایشی روغن ناپایدار ماهی کیلکا شوند. از این رو هدف از این پژوهش بهبود بایداری اکسایشی روغن ناپایدار ماهی کیلکا با استفاده از روغن‌های آنتی‌اکسیدانی مغز و پوست بنه و اجزاء صابونی ناشونده آنها می‌باشد.

مواد و روش

مواد

نمونه بنه (*Pistacia atlantica var mutica*) از شهرستان اسلام آباد در ایلام تأمین گردید. نمونه‌ها تا زمان استخراج و انجام آزمایش‌های مربوطه در پلاستیک‌های پلی اتیلنی دربسته و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. روغن‌های خام ماهی کیلکا از شرکت خزر از شهرستان بابلسر تهیه و تا زمان اجرای آزمایش‌ها در فریزر نگهداری (۱۸- درجه سانتی‌گراد) شدند. استاندارد متیل استر اسیدهای چرب و تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق از درجه آنالیتیکال بودند و از شرکت‌های مرک و سیگما تأمین گردیدند.

استخراج روغن بنه

پس از خشک کردن بنه در سایه، پریکارپ آن برداشته و مغز در آسیاب پودر شد. هر یک از روغن‌های پوست بنه و پودرهای مغز طی مدت ۴۸ ساعت با هگزان نرمال (به نسبت ۱ به ۴ وزنی حجمی) و تحت شرایط دمای محیط، تاریکی و همزدن استخراج شدند. حلال تحت خلأ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید. نمونه‌های روغن استخراج شده تا زمان اجرای آزمایش‌ها در ظروف تیره، تحت ازت و در فریزر (۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردیدند.

تخلیص روغن ماهی کیلکا

بمنظور حذف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در روغن ماهی و

¹ Purified Common Kilka oil

² HP-5890, Hewlett-Packard, CA, USA

³ Supel Co., Inc., Bellefonte, PA, 60 m×0.22 mm I.D., 0.2 μm film thickness

⁴ Flame Ionization Detector

کروماتوگرافی لایه نازک و بر حسب روش Lercker و Frega (۱۹۸۵) انجام شد.

کمیت‌های ساختاری

ترکیبات استرولی بر طبق واکنش رنگی لیبرمن بورچارد تعیین مقدار گردید (Sabir *et al.*, 2003). میزان ترکیبات توکوفرولی به روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد (Wong *et al.*, 1998). ترکیبات فنلی به روش طیف سنجی مبتنی بر معرف فولین سیوکالچینو تعیین مقدار گردید (Capannesi *et al.*, 2000). عدد یدی بر طبق روش AOAC (920.158) اندازه‌گیری شد.

پایداری اکسایشی

شاخص پایداری اکسایشی^۱ (OSI) تری آسیل گلیسرول خالص روغن ماهی کیلکا و روغنهای مغز و پوست به ترتیب در دماهای ۶۰ و ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان ۲۰ لیتر بر ساعت (OSI_{۶۰}، OSI_{۱۲۰}) با استفاده از دستگاه رنسیمت مدل ۷۴۳ تعیین شد (Farhoosh *et al.*, 2008a; Mendez *et al.*, 1996). بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مورد نظر، ۳ گرم از نمونه‌های تری آسیل گلیسرول خالص روغن ماهی کیلکا حاوی روغنهای مغز و پوست بنه (۱ و ۲ درصد)، مواد صابونی ناشونده آنها (۱ و ۱/۵ درصد) و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آلفاتوکوفرول و BHT (۱۰۰ پی پی ام) در دستگاه رنسیمت (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان هوا ۲۰ لیتر بر ساعت) حرارت‌دهی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام و نتایج در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس گردید. میانگین صفات با نرم افزار آماری MSTATC و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. به منظور ترسیم نمودارهای مربوطه از نرم افزارهای Excel و SlideWrite استفاده شد.

نتایج و بحث

ساختار شیمیایی و اسید چربی تری آسیل گلیسرول روغن ماهی کیلکا (PKO) و روغنهای مغز و پوست بنه در جدول ۱ نشان داده شده است. ساختار اسید چرب PKO به ترتیب شامل اسیدهای چرب تک غیر اشباع^۲، اشباع^۳ و چند غیر اشباع^۴ بود و هیچ‌گونه ترکیبات

توکوفرولی، فنلی و صابونی ناشونده در آن شناسایی نشد. بر اساس استاندارد دیارتمان سلامت انگلستان^۵، کمترین مقدار PUFA/SFA اعلام شده در روغن ماهی ۰/۴۵ می باشد، به این ترتیب PKO با نسبت PUFA/SFA معادل ۰/۷۳ کاملاً با این استاندارد مطابقت دارد (HMSO, UK, 1994). ساختار اسید چربی روغن پوست و مغز بنه نشان داد بخش اعظم اسیدهای چرب روغن مغز بنه را PUFA تشکیل داده‌اند، در حالی که اسید چرب غالب در روغن پوست بنه به ترتیب SFA و MUFA بوده‌اند. این ساختار اسید چرب برای روغنهای مغز و پوست بنه با نتایج گزارش شده توسط فرهوش و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت (جدول ۱).

مقادیر اسیدهای چرب EPA و DHA در PKO به ترتیب برابر ۶/۳۵ و ۵/۸۹ درصد بود و از این نظر تقریباً به روغن rainbow trout (از غذاهای دریایی ارزشمند و مغذی کشور ترکیه) شباهت داشتند (جدول ۱) (Celik *et al.*, 2008). EPA و DHA در کاهش LDL^۶ پلاسما و جلوگیری از بیماری‌های قلبی مؤثر می‌باشند. بعلاوه از آنجایی که EPA پیش‌ساز اسیدهای چرب امگا-۳ ایکوزانوئید می‌باشد، بعنوان مهمترین اسید چرب ضروری در گروه امگا-۳ نیز مورد توجه قرار می‌گیرد (Frankel, 1998; Uauy and Valenzuela, 2000). به دلیل بالا بودن مقادیر اسیدهای چرب امگا-۳ نسبت به امگا-۶ در PKO، نسبت امگا-۳ به امگا-۶ در این روغن برابر ۱/۶۰ بود (جدول ۱) و از این نظر با روغن ماهی Indian mackerel (Rastrelliger kanagurta) (۱/۶۷) مشابهت دارد (Osman *et al.*, 2001). مقادیر شاخص پلی‌ان و نسبت‌های امگا ۳ به امگا ۶ و PUFA/SFA نشان دادند PKO قابلیت اکسایش بالایی دارد و از این نظر استفاده از آنتی‌اکسیدان به منظور جلوگیری از اکسایش و بهبود کیفیت آن امری ضروری می‌نماید (جدول ۱) (Pirestani *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2001). مقایسه شاخص اکسایش پذیری PKO (OSI_{۶۰} برابر ۱/۶۶ ساعت) و روغن ماهیانی نظیر ساردین^۷ (OSI_{۶۰} ۶/۷ ساعت) و هیک لیور^۸ (OSI_{۶۰} ۶/۳ ساعت) نیز سهولت اکسایش روغن ماهی کیلکا را تأیید کرد (جدول ۱) (Frankel, 1998; Mendez *et al.*, 1996).

عدد یدی شاخصی از درجه غیر اشباعیت اسیدهای چرب روغن بوده و مقاومت روغن را در برابر اکسایش بیان می‌کند. بررسی عدد یدی PKO نشان داد عدد یدی روغن این ماهی (۱۱۴/۹۹) نسبت به روغن ماهیانی نظیر سالمون^۹ (۱۶۵/۸)، ساردین (۱۵۶/۲) و کد^۱ (۱۴۲)

5 UK Department of Health
6 Low density lipoprotein
7 Sardine
8 Hake liver
9 Salmon

1 Oil/Oxidative stability Index
2 Mono unsaturated fatty acid (MUFA)
3 Saturated fatty acid (SFA)
4 Poly-unsaturated fatty acid (PUFA)

استر متیل دی الکل‌های تری‌ترپنی مواد صابونی‌ناشونده روغن مغز و پوست بنه، به ترتیب ۱۵/۲۴ و ۳۱/۴۹ درصد از کل مواد صابونی‌ناشونده بود. ترکیبات استروئیدی از اهمیت بسزایی در شیمی روغن‌ها و چربی‌های خوراکی برخوردار هستند. فیتوسترول‌ها مانع از جذب کلسترول می‌شوند و از این طریق مقدار کلسترول سرم را کاهش می‌دهند (Ling and Jones, 1995). بعلاوه، فیتوسترول‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Wang et al., 2002).

تغییرات شاخص پایداری اکسایشی PKO (OSI_۶) در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی طی فرآیند حرارتی در شکل ۱ نشان داده شده است. طی اکسایش روغن ماهی، اسیدهای چرب چند غیراشباع آن سریعاً اکسید شده، تولید هیدروپراکسید (محصولات اولیه اکسایش) می‌کنند. هیدروپراکسیدها ترکیبات ناپایداری هستند و بلافاصله تجزیه شده، ترکیبات ثانویه فرار و غیرفرار نظیر الکل‌ها، هیدروکربن‌ها، آلدئیدها، کتون‌ها، اسیدهای آلی و ترکیبات اپوکسی تولید می‌نمایند. رنسیمت از جمله روش‌های تسریع شده بسیار شناخته شده در سنجش اکسایش‌پذیری روغن‌هاست که با استفاده از اعمال دما و تزریق هوا به داخل روغن، تغییر غلظت اسیدهای آلی تولید شده در اکسایش (اساساً اسید فرمیک) را بر اساس هدایت الکتریکی به طور خودکار اندازه‌گیری و تحت عنوان OSI بیان می‌کند. این روش بمنظور بررسی آثار آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف در روغن و نیز پایداری اکسایشی انواع روغن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Frankel, 1998). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است کلیه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی، شاخص اکسایش‌پذیری نمونه‌های PKO را افزایش دادند، گرچه در نمونه‌های حاوی روغن پوست و تیمار ۱ درصد روغن مغز، تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد ($p < 0.05$). بعلاوه، تأثیر اجزاء صابونی‌ناشونده روغن‌های مغز (۱ درصد) و پوست بنه (۱/۵ درصد) در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آلفاتوکوفرول و BHT (۱۰۰ پی‌پی‌ام) اختلاف معنی‌داری را در افزایش OSI_۶ نمونه‌های روغن نشان نداد ($p < 0.05$) (شکل ۱). بطور کلی در بین کلیه تیمارهای آنتی‌اکسیدانی، بیشترین تأثیر افزایش OSI_۶ در حضور ترکیبات صابونی‌ناشونده مغز (به ویژه در غلظت ۱/۵ درصد) مشاهده شد، بطوری که OSI_۶ نمونه شاهد در حضور غلظت ۱/۵ درصد از این ترکیب تا حدود ۸/۱۲ برابر افزایش یافت (شکل ۱). درحالی‌که این افزایش مقدار در حضور ۱۰۰ پی‌پی‌ام از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آلفاتوکوفرول و BHT حدود ۴/۵ برابر بود. هر یک از ترکیبات صابونی‌ناشونده مغز و پوست بنه در مقایسه با روغن آنها در غلظت‌های مشابه (۱ درصد) اثر بیشتری را در بهبود پایداری اکسایشی PKO نشان دادند. بعلاوه، افزایش غلظت این ترکیبات نیز اثر قابل ملاحظه‌تری را در مقایسه با روغن‌های مغز و پوست بنه به‌همراه داشت (شکل ۱).

کمتر می‌باشد (جدول ۱). از طرفی نتایج تحقیقات پیشین نشان داده است تفاوت در عدد یدی روغن‌ها ناشی از تفاوت ساختار اسید چربی آنهاست (Frankel, 1998; Endo et al., 2005).

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، روغن مغز بنه در مقایسه با پوست مقادیر بیشتری از ترکیبات صابونی‌ناشونده، توکوفرول کل، فنول کل و استرول‌ها را دارا بود. با توجه به تأثیر این ترکیبات در افزایش پایداری اکسایشی روغن‌ها می‌توان بالاتر بودن شاخص اکسایش‌پذیری (OSI_{۱۲}) روغن مغز بنه (۹/۴۶ ساعت) را در مقایسه با پوست (۷/۹۱ ساعت) به وجود این ترکیبات نسبت داد (جدول ۱) (Farhoosh and Sharif et al., 2009; Tavassoli Kafrani, 2010a,b; Sharayei et al., 2011a,b; Farhoosh et al., 2012).

جدول ۲ اجزاء تشکیل‌دهنده ترکیبات صابونی‌ناشونده روغن‌های مغز و پوست بنه را نشان می‌دهد. مواد صابونی‌ناشونده روغن‌های مغز و پوست بنه به هیدروکربن‌ها، کاروتن‌ها، توکوفرول‌ها و توکوتری-انول‌ها، الکل‌های خطی و تری‌ترپنی (۴ و ۴-دی متیل استرول)، متیل استرول‌ها (۴-متیل استرول)، استرول‌ها (دسمتیل استرول)، دی الکل‌های تری‌ترپنی و استر متیل دی الکل‌های تری‌ترپنی تفکیک شدند (جدول ۲). ترکیبات توکوفرولی و توکوتری‌انولی بیشترین میزان مواد صابونی‌ناشونده روغن مغز و پوست بنه را به ترتیب با ۶۰/۷۲ و ۵۱/۷۹ درصد از کل مواد صابونی‌ناشونده تشکیل دادند. این ترکیبات با داشتن نقش ویتامینی و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی از اهمیت زیادی در سلامتی انسان برخوردارند (Lercker and Rodriguez-Estrada, 2000). هیدروکربن‌های مواد صابونی‌ناشونده روغن مغز و پوست بنه، به ترتیب ۱۳/۷۷ و ۹/۷۹ درصد از کل مواد صابونی‌ناشونده را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). هیدروکربن‌ها عمدتاً ترکیبات خطی با تعداد کربن زیاد هستند. اغلب ترکیبات هیدروکربنی را مشتقات اسکوالن تشکیل می‌دهند (Lercker and Rodriguez-Estrada, 2000). اسکوالن دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بخصوص در درجه حرارت‌های بالاست (Rao and Achaya, 1968; Boskou, 1998). ترکیبات کاروتنی (بر حسب بتا-کاروتن)، به ترتیب ۱۰/۲۸ و ۶/۹۴ درصد از کل مواد صابونی‌ناشونده روغن مغز و پوست بنه را به خود اختصاص دادند. کاروتنوئیدها بعنوان آنتی‌اکسیدان‌های اولیه از طریق به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و یا بعنوان آنتی‌اکسیدان ثانویه از طریق فرونشانی اکسیژن یگانه عمل می‌کنند (Wanasundara and Shahidi, 2005). مقدار ترکیبات استروئیدی شامل الکل‌های خطی و تری‌ترپنی (۴ و ۴-دی متیل استرول)، متیل استرول‌ها (۴-متیل استرول)، استرول‌ها (دسمتیل استرول)، دی الکل‌های تری‌ترپنی و

جدول ۱- ساختار شیمیایی و اسید چربی روغن تخلیص شده ماهی کیلکا (PKO) و روغنهای مغز و پوست بنه^۱

شاخص	PKO	روغن پوست بنه	روغن مغز بنه
[%] اسید چرب			
C14:0	۶/۲۲ ± ۰/۰۵	-	-
C16:0	۱۷/۳۱ ± ۰/۰۱	۱۹/۷۰ ± ۰/۱۳ a	۹/۶۱ ± ۰/۱۲ b
C16:1 ω-7	۱۳/۲۳ ± ۰/۰۷	۱۶/۱۶ ± ۰/۱۲ a	۱/۳۶ ± ۰/۰۵ b
C17:0	۱/۸۹ ± ۰/۰۶	-	-
C18:0	۳/۲۳ ± ۰/۰۴	۲/۹۰ ± ۰/۰۱ a	۳/۰۴ ± ۰/۰۸ a
C18:1 ω-9	۳۷/۵۱ ± ۰/۰۶	۵۳/۲۷ ± ۰/۱۶ a	۵۱/۲۹ ± ۰/۱۳ b
C18:2 ω-6	۸/۱۶ ± ۰/۱۵	۴/۷۴ ± ۰/۰۶ b	۳۲/۸۳ ± ۰/۱۴ a
C18:3 ω-3	۱/۱۷ ± ۰/۰۹	۰/۸۵ ± ۰/۱۷ a	۰/۶۴ ± ۰/۰۶ a
C20:0	۱/۱۶ ± ۰/۰۶	-	-
C20:4 ω-6	۰/۲۱ ± ۰/۰۳	-	-
C20:5 (EPA) ω-3	۶/۳۵ ± ۰/۰۵	-	-
C22:6 (DHA) ω-3	۵/۸۹ ± ۰/۰۳	-	-
SFA	۲۹/۸۰ ± ۰/۱۲	۲۲/۶۰ ± ۰/۱۴ a	۱۲/۶۴ ± ۰/۰۴ b
MUFA	۴۰/۷۴ ± ۰/۰۱	۶۹/۴۳ ± ۰/۰۴ a	۵۲/۶۴ ± ۰/۰۸ b
ω-3 ^۲	۱۳/۴۰ ± ۰/۱۱	۰/۸۵ ± ۰/۱۷ a	۰/۶۴ ± ۰/۰۶ a
ω-3:ω-6	۱/۶۰ ± ۰/۰۵	۰/۱۸ ± ۰/۰۳ a	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ b
PUFA	۲۱/۷۷ ± ۰/۰۶	۵/۵۹ ± ۰/۲۳ b	۳۳/۴۷ ± ۰/۰۸ a
PUFA/SFA	۰/۷۳ ± ۰/۰۱	۰/۲۵ ± ۰/۰۱ b	۲/۶۵ ± ۰/۰۲ a
(EPA+DHA)/C16:0	۰/۷۱ ± ۰/۰۰۲	-	-
عدد یدی ^۳	۱۱۴/۹۹ ± ۱/۱۰	۷۱/۵۸ ± ۰/۵۳ b	۱۰۳/۹۲ ± ۰/۱۵ a
مواد صابونی ناشونده ^۳	-	۱/۳۹ ± ۰/۰۷ b	۲/۵۳ ± ۰/۳۰ a
ترکیبات توکوفرولی کل ^۳	-	۵۷۷/۸۶ ± ۶/۵۹ b	۶۳۳/۸۶ ± ۵/۳۷ a
ترکیبات فنولی کل ^۳	-	۱۲۶/۱۸ ± ۳/۳۰ a	۱۳۴/۳۱ ± ۴/۵۸ a
ترکیبات استرولی ^۳	-	۳/۳۹ ± ۰/۱۲ b	۴/۴۵ ± ۰/۱۸ a
شاخص اکسایش پذیری (OSI)	۱/۶۶ ± ۰/۲۳ ^۴	۷/۹۱ ± ۰/۴۰ ^۵ b	۹/۴۶ ± ۰/۵۶ ^۵ a

۱) ارقام دارای حروف مشترک در هر ردیف (میانگین ± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن، $P < ۰/۰۵$).

۲) امگا ۳: (C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:6 n-3)

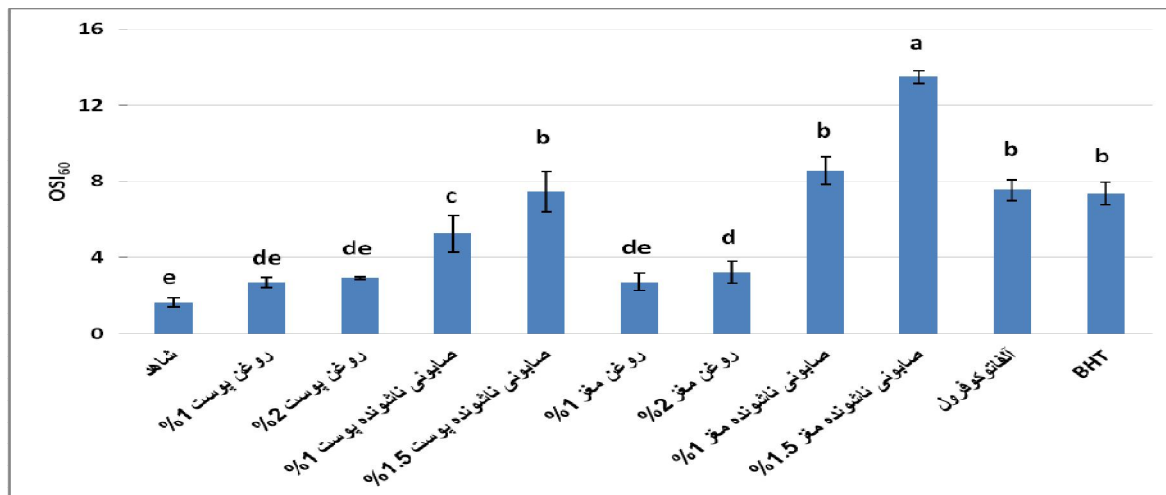
۳) عدد یدی (گرم ید بر صد گرم روغن)، مواد صابونی ناشونده (درصد از روغن)، ترکیبات توکوفرولی کل (میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در کیلوگرم روغن)، ترکیبات فنولی کل (میلی‌گرم اسید گالیک در کیلوگرم روغن)، ترکیبات استرولی (درصد)

۴) شاخص اکسایش پذیری در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (OSI_{۶۰})

۵) شاخص اکسایش پذیری در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد (OSI_{۱۲۰})

جدول ۲- مقدار اجزاء مواد صابونی ناشونده روغن‌های مغز و پوست بنه (درصد از کل مواد صابونی ناشونده)

روغن پوست بنه	روغن مغز بنه	فراکسیون
۹/۷۹ ± ۰/۶۲ b	۱۳/۷۷ ± ۰/۵۱ a	هیدروکربن‌ها
۶/۹۴ ± ۰/۲۵ b	۱۰/۲۸ ± ۰/۸۳ a	بنا- کاروتن‌ها
۵۱/۷۹ ± ۱/۲۴ b	۶۰/۷۲ ± ۱/۲۷۶ a	توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها
۲/۷۳ ± ۰/۰۸ b	۵/۰۰ ± ۰/۵۹ a	الکل‌های خطی و تری‌ترینی (۴' و ۴- دی متیل استرول‌ها)
۱۰/۸۹ ± ۰/۲۲ a	۳/۱۴ ± ۰/۵۶ b	متیل استرول‌ها (۴- متیل استرول)
۶/۴۵ ± ۰/۸۱ a	۲/۷۴ ± ۰/۷۷ b	استرول‌ها (۴- دسمتیل استرول‌ها)
۵/۶۹ ± ۰/۸۰ a	۳/۱۱ ± ۰/۶۱ b	دی‌الکل‌های تری‌ترینی
۵/۷۴ ± ۰/۹۳ a	۱/۲۷ ± ۰/۰۸ b	استرول‌های متیل دی‌الکل‌های تری‌ترینی



شکل ۱- شاخص پایداری اکسایشی (OSI₆₀) تری آسیل گلیسرول تخلیص شده روغن کیلکا در حضور روغن‌های مغز و پوست بنه (۱-۲ درصد وزنی/وزنی) و ترکیبات صابونی ناشونده آنها (۱-۱/۵ درصد وزنی/وزنی) در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آلفاتوکوفرول و BHT (۱۰۰ پی‌پی‌ام). ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن $P < 0.05$). تیرک‌های ترسیم شده بر بالای ستون‌ها نشان‌دهنده انحراف استاندارد داده‌های اندازه‌گیری شده است.

رادیکال‌های آزاد سبب تأخیر در تشکیل هیدروپراکسیدها و جلوگیری از تولید اسیدهای آلی در رنسیمت شده و به این ترتیب در جلوگیری از اکسایش روغن‌ها تأثیرگذار بوده‌اند (Wanasundara and Shahidi, 2005).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد ساختار اسید چربی روغن کیلکا اگرچه آن را در گروه منابع غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ قرار می‌دهد، لیکن موجبات اکسایش پذیری شدید این روغن را نیز فراهم می‌آورد. داده‌های آزمون رنسیمت در این تحقیق نیز مؤید این امر بود. نظر به اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات استخراج شده از مغز و پوست بنه می‌توان آن را به عنوان منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی در بهبود کیفیت و پایداری اکسایشی روغن کیلکا معرفی نمود و به این ترتیب مشکلات و نگرانی‌های ناشی از مصرف آنتی‌اکسیدانهای سنتزی را نیز کاهش داده و یا برطرف نمود.

علت این امر را می‌توان به بالاتر بودن درجه خلوص ترکیبات صابونی‌ناشونده نسبت داد. بررسی‌های پیشین اثر آنتی‌اکسیدانی روغن‌های مغز و پوست بنه را ناشی از وجود مقادیر زیاد ترکیبات توکوفرولی، فنلی، استرولی و صابونی‌ناشونده در این روغن‌ها دانسته‌اند شده‌است اثر آنتی‌اکسیدانی مواد صابونی‌ناشونده روغن‌های مغز و پوست بنه ناشی از اجزاء آنتی‌اکسیدانی تشکیل‌دهنده این ترکیبات بوده است و در این میان مؤثرترین اجزاء عبارت از توکوفرول‌ها و توکوتری انول‌ها و ترکیبات ترپنوئیدی نظیر ۴ و ۴-دی متیل استرول و دی‌الکل‌های تری‌ترپنی می‌باشند (Farhoosh et al., 2009; Sharif et al., 2009). از طرفی گزارش شده‌است اثر آنتی‌اکسیدانی مواد صابونی‌ناشونده روغن‌های مغز و پوست بنه ناشی از اجزاء آنتی‌اکسیدانی تشکیل‌دهنده این ترکیبات بوده است و در این میان مؤثرترین اجزاء عبارت از توکوفرول‌ها و توکوتری انول‌ها و ترکیبات ترپنوئیدی نظیر ۴ و ۴-دی متیل استرول و دی‌الکل‌های تری‌ترپنی می‌باشند (Farhoosh et al., 2011b; Farhoosh and Hosseini Yazdi, 2013). با توجه به ساختار شیمیایی روغن‌های مغز و پوست بنه (جدول ۱) و نیز اجزاء صابونی‌ناشونده آنها (جدول ۲) بالاتر بودن پایداری اکسایشی نمونه‌ها در حضور روغن مغز و ترکیبات صابونی‌ناشونده آن را می‌توان به بالا بودن ترکیبات صابونی‌ناشونده، توکوفرولی، فنلی و استرولی در مغز نسبت داد. بنظر می‌رسد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی با جذب

منابع

- توکلی، ج، فرهوش، ر. و حداد خداپرست، م. ح، ۱۳۸۷، بررسی ساختار شیمیایی روغن دو گونه رایج بنه (*Pistacia atlantica*) در ایران، هجدهمین کنگره ملی صنایع غذایی ایران.
- هنری، س، معموری، م، اکبری، ج، عنایتی فرد، ر، و حیدری، م، ۱۳۸۳، مقایسه روش‌های مختلف استخراج روغن از کبد کوسه ماهی و ماهی کیلکا و مقدار ویتامین‌های A و D در آنها، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، (۲) ۶، ۵۹-۵۰.
- AOAC: Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (USA) 2005.

- Belhaj, N., Arab-Tehrany, E., Linder, M., 2010, Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochem.*, 45, 187–195.
- Bosku, D., Morton, I. D., 1976, Effect of plant sterols on the rate of deterioration of heated oils. *Journal Science Food Agricultural*, 27, 928–932.
- Boskou, D., 1998, Frying temperatures and minor constituents of oils and fats. *Grasas y Aceites*, 49, 326–330.
- Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A., 2000, Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chem.*, 71, 553–562.
- Celik, M., Gokce, M. A., Basusta, N., Kucukgulmez, A., Tasbozan, O., Tabakoglu, S. S., 2008, Nutritional quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caught from the Ataturk dam lake in Turkey. *J. Muscle Foods.*, 19, 50–61.
- Cheng, Z., Ren, J., Li, Y., Chang, W., Chen, Z., 2003, Establishment of a quantitative structure activity relationship model for evaluating and predicting the protective potentials of phenolic antioxidants on lipid peroxidation. *Journal pharmaceut Science*, 92, 475–484.
- Connor, W. E., 2000, Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American j. Clinical Nutrition*, 71, S171–S175.
- Endo, Y., Tagiri-Endo, M., Kimura, K., 2005, Rapid determination of iodine value and saponification value of fish oils by near-infrared spectroscopy. *J. Food Sci.*, 70, 127–131.
- Farhoosh, R., Niazmand, R., Rezaei, M., Sarabi, M., 2008a, Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110, 587–592.
- Farhoosh, R., Tavakoli, J., Haddad Khodaparast, M. H., 2008, Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of *Pistacia atlantica* in Iran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 723–729.
- Farhoosh, R., Haddad Khodaparast, M. H., Sharif, A., 2009, Bene hull oil as a highly stable and antioxidative vegetable oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111, 1259–1265.
- Farhoosh, R., Tavassoli Kafrani, M. H., 2010a, Polar compounds distribution of sunflower oil as affected by unsaponifiable matters of Bene hull oil (BHO) and tertiary-butylhydroquinone (TBHQ) during deep-frying. *Food Chem.*, 122, 381–385.
- Farhoosh, R., and Tavassoli-Kafrani, M. H., 2010b, Frying performance of the hull oil unsaponifiable matter of *Pistacia atlantica* subsp. *mutica*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 343–348.
- Farhoosh, R., Tavassoli-Kafrani, M. H., Sharif, A., 2011a, Antioxidant activity of sesame, rice bran and bene hull oils and their unsaponifiable matters. *Eur J Lipid Sci Technol.*, 113, 506–512.
- Farhoosh, R., Tavassoli-Kafrani, M. H., Sharif, A., 2011b, Antioxidant activity of the fractions separated from the unsaponifiable matter of bene hull oil. *Food Chem.*, 126, 583–9.
- Farhoosh, R., Haddad-Khodaparast, M. H., Sharif, A., Hoseini-Yazdi, S. Z., Zamani-Ghalehshahi, A., 2012, Antioxidative and synergistic effects of bene kernel and hull oils during oxidation of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114, 1284–1291.
- Farhoosh, R., Hoseini-Yazdi, S. Z., 2013, Evolution of Oxidative Values during Kinetic Studies on Olive Oil Oxidation in the Rancimat Test. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91, 281–293.
- Fazel, M., Sahari, M. A., Barzegar, M., 2008, Determination of main tea seed oil antioxidants and their effects on common Kilka oil. *J. International Food Research*, 15, 209–217.
- Fazli, H., Zhang, Ch. I., Hay, D. E., Lee, Ch. W., 2009, Stock assessment and management implications of anchovy kilka (*Clupeonella engrauliformis*) in Iranian waters of the Caspian Sea. *Fisheries Research*, 100, 103–108.
- Frankel, E. N., 1998, Lipid oxidation, The Oily Press, Scotland (Dundee).
- HMSO, UK., 1994. Nutritional aspects of cardiovascular disease (report on health and social subjects No. 46). London: HMSO.
- Lercker, G., Rodriguez-Estrada, M.T., 2000, Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat containing foods. *Journal of Chromatogr A*, 881, 105–129.
- Lozano, Y. F., Mayer, C. D., Bannon, C., Gaydou, E. M., 1993, Unsaponifiable matter, total sterol and tocopherol contents of avocado oil varieties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 561–565.
- Ling, W. H., Jones, P. J. H., 1995, Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Science*, 57, 195–206.
- Matthaus, B., 2002, Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 50, 3444–3452.
- Mendez, E., Sanhueza, J., Speisky, H., Valenzuela, A., 1996, Validation of the Rancimat Test for the Assessment of the Relative Stability of Fish Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1033–1037.
- Namiki, M., 1990, Antioxidant/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 29, 273–300.
- Osman, H., Suriah, A.R., Law, E.C., 2001, Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian water. *Food Chem.*, 73, 55–60.
- Piggott, G. M., Tucker, B. W., 1990, Effect of Technology on nutrition. New York: Marcel Dekker.
- Pirestani, S., Sahari, M. A., Barzegar, M., Nikoopour, H., 2010, Lipid, cholesterol and fatty acid profile of some

- commercially important fish species from south Caspian sea. *J. Food Biochem.*, 34, 886–895.
- Pratt, D.E., 1992, Natural antioxidants from plant material. In: Phenolic Compounds in Food and Their Effect on Health. Huang, M.T., Ho, C.T., and Lee, C.Y., American Oil Chemist's Society, Washington, DC.
- Rao, M.K., Achaya, K. T., 1968, Antioxidant activity of squalene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 296.
- Sharayei, P., Farhoosh, R., Poorazrang, H., Haddad Khodaparast, M. H., 2011a, Effect of bene kernel oil on the frying stability of canola oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 647–654.
- Sharayei, P., Farhoosh, R., Poorazrang, H., Haddad Khodaparast, M. H., 2011b, Improvement of canola oil frying stability by bene kernel oil's unsaponifiable matter. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 993–1000.
- Sharif, A., Farhoosh, R., Haddad Khodaparast, M. H., Tavassoli Kafrani, M. H., 2009, Antioxidant activity of bene hull oil compared with sesame and rice bran oils during the frying process of sunflower oil. *J. Food Lipids*, 16, 394–406.
- Sharina, s., Jumat, s., 2006, physicochemical characteristics of aji-fish seriola nigrofasciata lipid. *Malaysia J. Analytical Sci.*, 10, 55–58.
- Sabir, S. M., Hayat, I., Gardezi, S. D. A., 2003, Estimation of sterols in edible fats and oils. *Pak. J. Nutr.* 2, 178–181.
- Sims, R. J., Fioriti, J. A., Kanuk, M., 1972, Sterol additives as polymerization inhibitors in frying oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 49, 298–301.
- Uauy, R., Valenzuela, A., 2000, Marine oils: The health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, 16, 680–684.
- Wanasundara, N. U., Shahidi, F., 1998, Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem.*, 63(3), 335–342.
- Wanasundara, P. K., Shahidi, F., 2005. Antioxidants: science, technology, and applications. In Bailey's industrial oil and fat products. Shahidi, F. (Eds). John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Wang, T., Hicks, K. B., Moreau, R., 2002, Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other conjugates. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 1201–1206.
- Warner, C., Daniels, D., Lin, F., Joe, F., Fazio, T., 1986, Fate of antioxidants and antioxidant-derived products in deep-fat frying and cookie baking. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 34, 1–5.
- Wong, M. L., Timms, R. E., Goh, E. M., 1988, Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 258–261.

Oxidative stability of Purified Common Kilka (*Clupeonella cultiventris caspia*) triacylglycerols as affected by the Bene kernel and hull oils and their Unsaponifiable matters

S. Pazhouhanmehr¹, R. Farhoosh^{2*}, R. Esmailzadeh Kenari³, A. Sharif⁴

Received: 2014.03.10

Accepted: 2014.06.14

Introduction: Common Kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) is one of the most abundant and industrial fish in the Caspian Sea located in the north of Iran, and also the best source of long-chain polyunsaturated fatty acids, especially EPA and DHA [Fazli *et al.*, 2009, Connor, 2000]. Due to high level of the ω_3 : ω_6 ratio and polyene index, the common Kilka oil is expected to be highly susceptible to oxidation [Pirestani *et al.*, 2010]. The interesting antioxidative characteristics of the oils and unsaponifiable matter (USM) extracted from the kernel and hull of bene fruit (*Pistacia atlantica subsp. Mutica*) attracted our attention to use them as natural alternatives for stabilizing the common Kilka oil and compare with BHT and α -tocopherol [Farhoosh *et al.*, 2012].

Materials and method:

The ripe bene fruits were collected from the fields of Islamabad in the Ilam province. After drying and also grounding to powder, the oils from the kernel (BKO) and the hull (BUO) of bene were extracted with *n*-hexane (1:4 w/v). Moreover, the USM content of the kernel (UKO) and hull (BHO) oils of bene were determined by the method described by Lozano *et al.*, 1993. Chemical compositions of the bene oils' unsaponifiable matter were determined by a thin-layer chromatography [Lercker and Rodriguez-Estrada, 2000]. Crude Kilka oil was purified by a multilayer column chromatography to eliminate the majority of pro-oxidant and antioxidant compounds normally present in it. The purified Kilka oil (PKO) was blended separately with 1 and 2% (w/w) of the antioxidative oils (BKO and BHO), 1 and 1.5% (w/w) of the oils' unsaponifiable matter (UKO and UHO), and 100 mg/kg α -tocopherol and BHT and then exposed to the following stability test. Fatty acid composition of the oil samples was determined by gas-liquid chromatography [Sharina and Jumat, 2006]. The iodine value (IV) was measured according to the AOAC Official Method 920.158 [AOAC, 2005]. A colorimetric method was used to determine total tocopherols (TT) content [Wong *et al.*, 1988]. Total phenolics (TP) content was spectrophotometrically determined using Folin-Ciocalteu's reagent [Capannesi *et al.*, 2000]. A Metrohm Rancimat model 743 (Herisau, Switzerland) was used for the oil/oxidative stability index (OSI) measurement in airflow rate of 20 L/h. The temperatures in measuring of the OSI were 60 °C for the PKO, OSI60, and 120 °C for the BHO and BKO, OSI120 [Farhoosh *et al.*, 2008a; Mendez *et al.*, 1996]. The analysis of variance (ANOVA) was carried out according to MStatC and SlideWrite software. Significant differences between means were determined by Duncan's multiple range tests; *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results and Discussion: The initial quality parameters of the PKO, BHO and BKO are shown in Table 1. The PKO was mainly constituted of MUFA, followed by the SFA and PUFA, and there was no measurable contents of TP, TT and USM fractions in it. The PKO showed a PUFA/SFA ratio higher than the minimum value recommended by the UK Department of Health (0.73 vs. 0.45) [HMSO. UK., 1994]. The ω_3/ω_6 ratio of the PKO was relatively similar to that of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) (1.60 and 1.67, respectively) (Table 1) [Osman, Suriah, & Law, 2001].

The IV, as an indicator of the oil unsaturation and resistance to oxidation, for the PKO (114.99) was much lower than sardine (156.2) and salmon (165.8) oils [Frankel, 1998; Endo, Tagiri-Endo, & Kimura, 2005].

As can be seen in Table 1, the BKO had higher contents of the USM, tocopherols and phenolic compounds

1, 2 and 4- PhD student, Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Sari, Sari, Iran.

(*Corresponding author: rfarhoosh@um.ac.ir)

than the BHO. The valuable effects of minor components especially polyphenols and tocopherols of the BHO and BKO on the oxidative stability of vegetable oils have been shown in the previous studies [Farhoosh et al., 2012]. The differences in the fatty acid composition and the amounts of minor components led to the greater OSI₁₂₀ of the BKO than the BHO (9.46 vs. 7.91 h).

The major constituents of the UHO and UKO were tocopherols and tocotrienols (Table 2). These compounds, which are particularly important functional constituents of the USM of vegetable oils, have nutritional importance for human health and render antioxidative properties [Lercker and Rodriguez-Estrada, 2000].

The OSI₆₀ values of the PKO as affected by the antioxidative compounds are presented in Fig 1. As shown in Fig. 1, the OSI₆₀ of the PKO (1.66 h) significantly increased in presence of the antioxidants added. Moreover, the highest significant stabilizing effect belonged to the UKO 1.5%, so that it was able to increase significantly the OSI₆₀ up to 8.12 fold (OSI₆₀, 13.48 h) ($p < 0.05$). Previous findings have demonstrated antioxidant activities of the constituents of the UKO and UHO in vegetable oils. In addition, it has been reported that the fraction of tocopherols and tocotrienols, and terpenoid compounds, particularly triterpenic dialcohols and 4,4'-dimethylsterols, possess antioxidative effects, in overall, better than those of other fractions examined [Farhoosh et al., 2008; Sharif et al., 2009]. Due to the higher amounts of these active fractions (Table 2), the UKO showed higher antioxidative effect on the PKO stability.

Keywords: Oxidative stability- triacylglycerols - bene oil- kilka- unsaponifiable matter

مقایسه برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سه ژنوتیپ زرشک دانه‌دار بومی استان سمنان

محمد فرهادی چیتگر^۱، مهدی وریدی^{۲*}، محمدجواد وریدی^۳، احمد بالندری^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۳۰

چکیده

کسب اطلاعات در مورد گیاهان بومی بعنوان منابع غذایی عملگر (فراسودمند) رو به افزایش است. یکی از این گیاهان، گونه‌های وحشی زرشک (*Berberis. spp.*) می‌باشد که بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها می‌تواند زمینه کاربردشان را در صنایع غذایی و دارویی فراهم کند. لذا در این پژوهش بمنظور معرفی بیشتر این گیاه ارزشمند بومی، سه ژنوتیپ موجود در باغ کلکسیون زرشک پژوهشکده علوم و صنایع غذایی در سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری و برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که بین خصوصیات فیزیکی بررسی شده فقط در طول میوه سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود داشت. هر سه ژنوتیپ حاوی میزان بالای چربی، پروتئین، کربوهیدرات و خاکستر بودند. ژنوتیپ نوشین دارای بالاترین قند احیاکننده (0.222 ± 0.038) و در نتیجه دارای مزه شیرین‌تری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر بود. هر سه ژنوتیپ در مقایسه با سایر میوه‌ها رنگی نظیر شاتوتو زغال اخته حاوی مقادیر قابل توجهی آنتوسیانین ($3927/60 - 950/17$ میلی‌گرم/لیتر) و ترکیبات فنلی ($12/35 - 9/75$ گرم/لیتر) بودند که بیانگر خواص سلامت‌بخش این میوه‌های خودرو و بومی می‌باشد. بلحاظ مواد معدنی هر سه ژنوتیپ غنی از ریزمغذی‌های مورد نیاز بدن انسان نظیر پتاسیم، کلسیم، منیزیم و روی بودند.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، زرشک، خواص فیزیکی شیمیایی، فراسودمند

مقدمه

خشک، در تهیه‌ی فرآورده‌های غذایی مثل ژله، شربت، مارمالاد، نکتار و لواشک نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (بالندری و کافی، ۱۳۸۱). بربرین آلکالوئید اصلی ساقه و ریشه زرشک است که با شناخت اثرات مفید آن کاربرد وسیعی در صنایع دارویی پیدا کرده‌است (Fatehi et al. 2005). جنس زرشک دارای بیش از ۶۶۰ گونه است (Ahrendt, 1961) که از این بین چهار گونه *B. integerrima*, *B. orthobotrys* و *B. vulgaris* در نقاط مختلف ایران بخصوص خراسان یافت می‌شوند. زرشک زرافشانی گونه‌ای از زرشک وحشی و دانه‌دار است که بطور خودرو در مناطق مختلف ایران از قبیل آذربایجان، سمنان، لرستان، فارس، تهران، گرگان و خراسان رشد می‌کند. تغییرات موجود در این گونه حائز اهمیت زیادی است و با سایر گونه‌ها، دورگ تولید می‌کند. این گونه در منطقه ایرانیکا (آسیای صغیر) نیز پراکنش زیادی دارد. میوه آن تخم‌مرغی شکل به رنگ قرمز تا ارغوانی است که بطور تازه خوری و یا در تهیه غذاهای سنتی استفاده می‌شود (آزادی، ۱۳۸۸). میوه‌ی زرشک بی‌دانه به دلیل دارا بودن رنگ مناسب و طعم دلپذیر، علاوه بر استفاده بصورت میوه خشک، در تهیه‌ی فرآورده‌های غذایی مختلفی مثل مربا، ژله، شربت، مارمالاد، نکتار و لواشک نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (بالندری و

امروزه توجه به غذاهای عمل گر (فراسودمند)^۱ که علاوه بر نقش نقش تغذیه‌ای نقش دارویی نیز دارند رو به افزایش است. لذا کسب اطلاعات در مورد گیاهان بومی بعنوان منابع غذایی جدید یک ضرورت محسوب می‌شود. گیاهان بومی زیادی در مناطق مختلف کشور یافت می‌شوند که بطور محدود و به شکل سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از این گیاهان گونه‌های وحشی زرشک می‌باشند. زرشک‌ها (*Berberis. spp.*) گروه بزرگی از درختچه‌های خاردار همیشه سبز از تیره زرشکیان (*Berberidaceae*) هستند که قسمت‌های مختلف آنها شامل ریشه، برگ، پوست و میوه از گذشته‌های دور در ایران بعنوان دارو استفاده می‌شده است. در طب سنتی ایران خواص ضدتب و تنظیم ضربان قلب برای قسمت‌های مختلف زرشک بیان شده است (زرگری، ۱۳۷۵). میوه‌ی زرشک به دلیل دارا بودن رنگ مناسب و طعم دلپذیر، علاوه بر استفاده بصورت

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استادیار، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، خراسان رضوی، ایران
(*) - نویسنده مسئول: (Email: m.varidi@um.ac.ir)

صنایع غذایی مشهد جمع‌آوری شد (شکل ۱). به این صورت که برای هر ژنوتیپ ۳ درختچه بطور تصادفی انتخاب و میوه‌ها نیز بطور تصادفی از تمام شاخه‌های هر درختچه جمع‌آوری و با هم مخلوط شدند و در کیسه‌های پلاستیک پلی‌اتیلنی قرار گرفتند. در آزمایشگاه میوه‌های خیلی رسیده و صدمه دیده جدا شد و سپس هر نمونه به سه قسمت تقسیم گردید و خواص فیزیکی و شیمیایی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

خواص فیزیکی

برای اندازه‌گیری ابعاد میوه، ۱۰۰ نمونه بطور تصادفی انتخاب و طول (L)، عرض (W) و ضخامت (T) آنها توسط میکرومتر دیجیتالی مدل (QLR digit-IP54, China) دارای دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میانگین هندسی قطر (Dg) و ضریب کرویت میوه‌ها (φ) به ترتیب از فرمول‌های ذیل استفاده شد (Mohsenin, 1978).

$$D_g = (LWT)^{1/3} \quad (1)$$

$$\phi = D_g/L \quad (2)$$

سطح دانه‌ها (S) با استفاده از فرمول ذیل بدست آمد (Maccabe, 1986):

$$S = \pi D_g^2 \quad (3)$$

برای اندازه‌گیری جرم واحد، هر نمونه توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن گردید. برای تعیین نسبت وزن هسته به میوه بطور تصادفی ۱۰۰ عدد نمونه انتخاب و توزین شد، سپس هسته‌های آنها توسط دست جدا و پس از توزین بر وزن کل میوه تقسیم گردید.

خواص شیمیایی

اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها ابتدا طیف جذبی آنتوسیانین‌های عصاره زرشک‌ها در بافر pH=۱ در دامنه ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر^۲ ترسیم گردید (شکل ۲). با توجه به طیف جذبی بیشترین جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر برای ژنوتیپ نوشین، ۵۱۲ نانومتر برای ژنوتیپ نگارین و ۵۱۶ نانومتر برای ژنوتیپ پرچین بدست آمد (شکل ۲). میزان آنتوسیانین‌های کل ژنوتیپ‌های زرشک بر اساس روش pH افتراقی توصیف شده توسط Lee و همکاران (۲۰۰۵) بدین صورت محاسبه شدند که ابتدا عصاره زرشک‌ها با بافرهای کلریدپتاسیم (pH=۱) و استات سدیم (pH=۴/۵) رقیق و جذب آنها در طول موج حداکثر و طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد، سپس از

کافی، ۱۳۸۱). زرشک دارای ترکیبات زیست فعال^۱ با اثرات درمانی می‌باشد و می‌توان از آنها بطور گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.

Shahverdi و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که عصاره اتانولی هسته زرشک زرافشانی باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی سفالکسین و سفتریزولگزامید بر روی باکتری‌های استفیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی می‌شود. Fatehi و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که میوه زرشک بی‌دانه دارای اثرات مفیدی بر روی سیستم قلبی و عصبی دارد. همچنین این محققان اظهار داشتند که میوه زرشک می‌تواند در درمان فشار خون بالا و مشکلات عصبی نظیر تشنج و صرع استفاده شود. Akbulut و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که گونه *B. vulgaris* غنی از آنتوسیانین، ترکیبات فنلی و املاح کلسیم و پتاسیم می‌باشد. Andola و همکاران (۲۰۱۱) خصوصیات شیمیایی و تغذیه‌ای هسته و پالپ ۵ گونه زرشک وحشی کشور هند را مورد بررسی قرار دادند. فرهادی و همکاران (۱۳۹۱) برخی از خصوصیات شیمیایی زرشک سیاه استان خراسان شمالی را مورد بررسی قرار دادند و این گونه را بعنوان یکی از منابع غنی از آنتوسیانین و ترکیبات فنلی معرفی کردند. Ozgen و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی خصوصیات شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی ۶ زرشک وحشی از گونه زرشک بی‌دانه کشور ترکیه، این زیرگونه‌ها را بعنوان منابع مهم ترکیبات آنتی‌اکسیدانی معرفی کردند.

افزایش روزافزون نقش اقتصادی محصولات کشاورزی و غذایی در جوامع امروزی و پیچیدگی فناوری‌های مدرن برای تولید، حمل و نقل، ذخیره‌سازی، فرآوری، نگهداری، ارزیابی کیفی، توزیع، بازاریابی و مصرف این محصولات، نیازمند درک دقیق و صحیح خواص فیزیکی و شیمیایی است (رضوی و اکبری، ۱۳۸۸). دسترسی به اطلاعات علمی در رابطه با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی انواع زرشک وحشی جهت طراحی بهینه تجهیزات فرآوری آنها همچنین معرفی آنها بعنوان غذاهای فراسودمند ضروری بنظر می‌رسد. با توجه بوجود رویشگاه‌های متعدد زرشک در کشورمان، و نبود مطالعه جامعی در رابطه با گونه‌های وحشی، هدف از این پژوهش بررسی برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سه ژنوتیپ زرشک وحشی غالب در استان سمنان که بیشتر بطور محلی مصرف می‌شوند بمنظور معرفی و کاربرد بیشتر آنها در صنایع غذایی و دارویی بوده است.

مواد و روش

مواد

میوه رسیده سه ژنوتیپ زرشک دانه‌دار (این سه ژنوتیپ بومی استان سمنان هستند) از باغ کلکسیون زرشک پژوهشکده علوم و

²ShimadzuUV-160A, Japan

¹Bioactive

اندازه‌گیری فنل کل

اندازه‌گیری پلی فنل کل به روش فولین سیوکالچون انجام گرفت (Lee et al, 2007). ۳/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر به سل حاوی ۴۰ میکرولیتر نمونه اضافه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو به آن افزوده شد. مخلوط به مدت ۱ تا ۸ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و پس از آن ۶۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۵ درصد به سل اضافه شد. پس از حداکثر ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. نتایج بصورت گرم هم ارز گالیک اسید بر لیتر عصاره گزارش شد (Lee et al., 2002).

رابطه زیر میزان آنتوسیانین‌ها بر اساس سیانیدین ۳-گلیکوزید تعیین گردید:

$$A = A_{510} - A_{700} \quad (4)$$

DF: فاکتور رقت

A: اختلاف بین دو جذب

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5} \quad (5)$$

Mw: جرم مولکولی سیانیدین ۳-گلیکوزید (۴۴۹/۲ گرم / مول)

C: جذب مولی (۲۶۹۰۰ لیتر / مول / سانتی‌متر)

L: طول سل بر حسب سانتی‌متر (۱ سانتی‌متر)

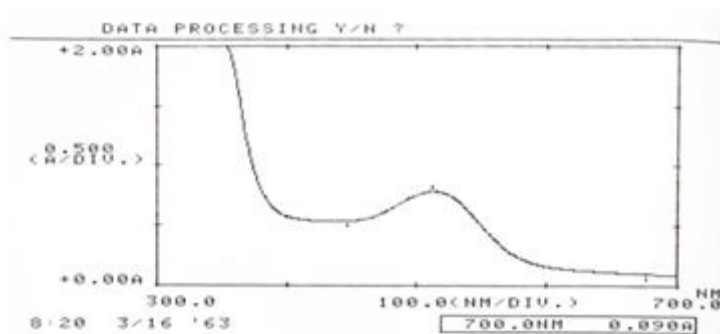


ژنوتیپ پرچین

ژنوتیپ نوئین

ژنوتیپ نگارین

شکل ۱- تصویر میوه‌های سه ژنوتیپ زرشک



شکل ۲- طیف جذبی عصاره ژنوتیپ نگارین در بافر pH=1 در طول موج ۷۰۰-۳۰۰

دیجیتالی، قندهای احیاکننده بر اساس روش لین‌آینون، اسیدیته کل به روش پتانسیومتری مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۵ انجام شد. برای اندازه‌گیری فاکتورهای رنگی از دستگاه رنگ‌سنج^۱ استفاده شد و برای محاسبه سیری یا اشباعیت^۲ از رابطه $\sqrt{a^2 + b^2}$ استفاده شد (Maskan, 2006).

سایر پارامترها

رطوبت با استفاده از روش آون در ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و میزان چربی با روش سوکسله و حلال دی‌اتیل‌اتر به مدت ۶ ساعت اندازه‌گیری شد. پروتئین با روش کج‌لدال و ضریب (۶/۲۵ ازت) و خاکستر به روش سوزاندن در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت و کربوهیدرات کل از کم کردن مقادیر پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر از ۱۰۰ محاسبه شد (Indrayan et al, 1989).

pH عصاره‌ها با pH متر (Metrolab)، بریکس با رفاکتومتر

^۱Konica monoltaB406479, Japan

^۲Chroma

میلی مترمربع، ۱۵۵/۹۳ گرم، ۰/۷۳ گرم/سانتی مترمکعب، ۰/۴۴ گرم/سانتی مترمکعب و ۳۸/۱۵ به دست آوردند. بین نتایج این محققان و نتایج حاصل از این پژوهش تفاوت وجود دارد که این تفاوت می تواند مربوط به شرایط آب و هوایی زمان برداشت و متفاوت بودن ژنوتیپ باشد. Topuz و همکاران (۲۰۰۵) متفاوت بودن خصوصیات فیزیکی چهار واریته پرتغال را به تفاوت در نوع واریته و شرایط اقلیمی مناطق تولید آنها نسبت دادند. Vursavus و همکاران (۲۰۰۶) نیز تفاوت در خصوصیات فیزیکی سه واریته گیلاس را به متفاوت بودن شرایط محیطی رشد آنها نسبت دادند.

ولایتی و همکاران (۱۳۹۰) اثر محتوای رطوبت بر برخی خواص فیزیکی زرشک بی دانه را مورد بررسی قرار دادند، نتایج آنها نشان داد که تغییر محتوای رطوبت در سطح معنی داری ۵ درصد موجب تغییر معنی داری در پارامترهای ابعاد، قطر متوسط هندسی، ضریب کرویت، سطح رویه، جرم هزار دانه، چگالی واقعی، چگالی توده، تخلخل می شود، بنابراین یکی دیگر از فاکتورهایی که باعث تفاوت در نتایج حاصل از خصوصیات فیزیکی شده است تفاوت در میزان رطوبت نمونه ها می باشد.

جدول ۲ ارتباط و ضریب همبستگی بین عرض و سایر خصوصیات هندسی را در سه ژنوتیپ زرشک زرافشانی نشان می دهد بین عرض / ضخامت، عرض / ضریب کرویت و عرض / میانگین هندسی قطر ارتباط آماری معنی داری در سطح $P < 0.05$ در دو ژنوتیپ پرچین و نوشین وجود داشت. در واریته نگارین علاوه بر روابط بالا بین عرض / طول ارتباط آماری معنی داری در سطح $P < 0.01$ وجود داشت. برای بیان ارتباط عرض با سایر پارامترهای فوق معادلات رگرسیونی زیر بدست آمد.

$$Dg + 1/614Sp + 9/0.02T - 1/0.19 L6/978 + 0/129W = \text{ژنوتیپ پرچین}$$

$$Dg + 2/566 Sp - 0/739T - 0/971 L0/46 - 0/631W = \text{ژنوتیپ نوشین}$$

$$Dg + 2/660Sp - 4/980T - 0/935 L - 0/3699/0.18W = \text{ژنوتیپ نگارین}$$

Akbulut و همکاران (۲۰۰۷) روابط معناداری بین عرض میوه زرشک بی دانه (*B. vulgaris*) با پارامترهای طول، ضخامت، میانگین هندسی قطر و ضریب کرویت آن بدست آوردند. Vursavus و همکاران (۲۰۰۶) نیز روابط رگرسیونی بین جرم میوه سه گونه گیلاس با عرض، طول، ضخامت و میانگین هندسی قطر آنها گزارش کردند.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

اندازه گیری ابعاد و جرم واحد در ۱۰۰ تکرار و بقیه خصوصیات در سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سه ژنوتیپ با استفاده از طرح کاملا تصادفی و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام شد. تجزیه آماری بوسیله نرم افزار SPSS16.0 انجام گرفت

نتایج و بحث

خصوصیات فیزیکی

برخی از خصوصیات فیزیکی سه ژنوتیپ زرشک در جدول ۱ آورده شده است همانطور که مشاهده می شود بین خصوصیات فیزیکی فقط در طول میوه، بین سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی داری در سطح ($P < 0.05$) وجود دارد. مقادیر طول، عرض و ضخامت میوه ها به ترتیب در ژنوتیپ نگارین بین ۱۲/۵۲-۱۰/۶۱ میلی متر، ۵/۵۹-۴/۰۳ میلی متر و ۵/۹۹-۴/۸۳ میلی متر، در ژنوتیپ پرچین بین ۹/۴۷-۷/۰۸ میلی متر، ۶/۵۸-۴/۷۲ میلی متر و ۶/۶۸-۴/۹۸ میلی متر و در ژنوتیپ نوشین بین ۹/۶۰-۸/۲۰ میلی متر، ۶/۹۸-۴/۳۱ میلی متر و ۴/۴۸-۴/۱۴ میلی متر متغیر بود. بین ضریب کرویت، میانگین هندسی قطر و درصد جرم هسته به میوه سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی داری در سطح ($P < 0.05$) وجود نداشت. در بین سه ژنوتیپ ضریب کرویت ژنوتیپ پرچین (۰/۷۴۸) در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر بیشتر بود. ژنوتیپ نگارین در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر دارای جرم واحد بیشتری بود. تعداد هسته ها در سه ژنوتیپ بین ۱ تا ۴ عدد متغیر بود که در ژنوتیپ نوشین ۱۱/۸۸ درصد وزن مرطوب و در ژنوتیپ نگارین ۱۰/۸۴ درصد وزن مرطوب و در ژنوتیپ پرچین ۱۰/۶۸ درصد وزن مرطوب آن را تشکیل می داد (جدول ۱).

Akbulut و همکاران (۲۰۰۹) مقادیر طول، عرض، ضخامت، میانگین هندسی قطر، ضریب کرویت، جرم واحد، دانسیته حقیقی، دانسیته توده و حجم زرشک بی دانه (*B. vulgaris*) کشور ترکیه را به ترتیب ۷/۶۹ میلی متر، ۳/۳۲ میلی متر، ۳/۵۱ میلی متر، ۴/۴۶ میلی متر، ۰/۵۶، ۰/۰۷، ۱/۱۱ کیلوگرم/مترمکعب، ۵۵۸/۱ کیلوگرم/مترمکعب و ۷۱ میلی مترمکعب به دست آوردند. ولایتی و همکاران (۱۳۹۰) مقادیر طول، عرض، ضخامت، میانگین هندسی قطر، ضریب کرویت، سطح، جرم هزار دانه، دانسیته حقیقی، دانسیته توده و تخلخل زرشک بی دانه را در رطوبت ۷۶-۷۰ به ترتیب ۱۰/۳۱ میلی متر، ۶/۴۹ میلی متر، ۶/۱۲ میلی متر، ۷/۴۲ میلی متر، ۰/۹۹/۷۲

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی میوه سه ژنوتیپ زرشک

پارامتر فیزیکی	نوشین	نگارین	پرچین
طول (میلی‌متر)	۹/۰۸±۰/۴۴ ^c	۱۱/۳۵±۰/۵۸ ^b	۸/۵۸±۰/۶۲ ^a
عرض (میلی‌متر)	۵/۶۴±۰/۷۸ ^c	۴/۹۴±۰/۴۳ ^a	۵/۴۰±۰/۴۹ ^{a,c}
ضخامت (میلی‌متر)	۵/۶۷±۰/۴۴ ^a	۵/۲۸±۰/۴۷ ^a	۵/۶۸±۰/۴۴ ^a
میانگین هندسی	۶/۵۳±۰/۵۶ ^a	۶/۶۶±۰/۴۸ ^a	۶/۴۰±۰/۳۹ ^a
ضریب کرویت	۰/۷۱۸±۰/۰۵۱ ^a	۰/۵۸۶±۰/۰۲۳ ^b	۰/۷۴۸±۰/۰۵۳ ^a
سطح جانبی	۱۳۴/۶۴±۲۲/۵۶ ^b	۱۳۹/۹۶±۲۰/۰۳۰ ^b	۱۱۹/۱۲±۳۷/۳۳ ^a
جرم واحد (گرم)	۰/۱۶۷±۰/۰۴۶ ^a	۰/۲۰۶±۰/۴۳ ^a	۰/۱۴۰±۰/۰۳۱
درصد جرم هسته	۱۱/۸۸±۲/۴۸ ^a	۱۰/۸۴±۲/۹۹ ^a	۱۰/۶۸±۲/۳۰ ^a

جدول ۲- ضریب همبستگی بین طول و سایر پارامترهای فیزیکی در سه ژنوتیپ زرشک

واریته	نسبت	درجه آزادی	ضریب همبستگی
پرچین	عرض/طول	۹۹	۰/۶۲۹
	عرض/ضخامت	۹۹	۰/۹۵۱
	عرض/میانگین هندسی	۹۹	۰/۸۴۴
	عرض/ضریب کرویت	۹۹	۷/۲۱۹
نوشین	عرض/طول	۹۹	۰/۶۲۱
	عرض/ضخامت	۹۹	۰/۹۹۴
	عرض/میانگین هندسی	۹۹	۰/۸۶۴
	عرض/ضریب کرویت	۹۹	۷/۸۵۵
نگارین	عرض/طول	۹۹	۰/۴۳۵
	عرض/ضخامت	۹۹	۰/۹۳۶
	عرض/میانگین هندسی	۹۹	۰/۷۴۲
	عرض/ضریب کرویت	۹۹	۸/۴۳۰

خصوصیات شیمیایی

جدول ۳ خصوصیات شیمیایی سه ژنوتیپ زرشک را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج ارائه شده بین اغلب خصوصیات شیمیایی سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) وجود دارد. ژنوتیپ نگارین دارای رطوبت و در نتیجه عصاره بیشتری نسبت به دو واریته دیگر بود. میانگین مقدار چربی، پروتئین و کربوهیدرات به ترتیب در دامنه ۲/۷۰-۲/۰۴، ۵/۲۵-۳/۸۲ و ۲۳/۹۷-۲۱/۶۸ درصد بین ژنوتیپ‌ها متغیر بود. ژنوتیپ نوشین در مقایسه با دو ژنوتیپ نگارین و پرچین دارای مقادیر بیشتر چربی، کربوهیدرات و خاکستر بود. بیشترین میزان پروتئین برای ژنوتیپ نوشین بدست آمد. بین میزان چربی و کربوهیدرات در بین سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) وجود نداشت. بالا بودن میزان چربی، پروتئین، کربوهیدرات، خاکستر در بین این ژنوتیپ‌ها را می‌توان به وجود هسته در این ژنوتیپ‌ها نسبت داد (فرهادی و همکاران، ۱۳۹۲). Andola و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی

خصوصیات شیمیایی و تغذیه‌ای هسته و پالپ ۵ گونه زرشک وحشی کشور هند (*B. lyceum*، *B. jaeschkeana*، *B. pseudumbellata*، *B. asiatica*، *B. Aristata*) به این نتیجه رسیدند که هسته این ۵ گونه در مقایسه با پالپ آنها دارای مقادیر بیشتری پروتئین و کربوهیدرات است.

Sood و همکاران (۲۰۱۰) مقادیر رطوبت، چربی، کربوهیدرات، پروتئین، خاکستر و فیبر خام زرشک *B. lycium* کشور هند را به ترتیب ۸۳/۲۹، ۰/۶۳، ۱۵/۴۵، ۱/۸۱، ۰/۸۲ و ۰/۸۱ درصد بدست آوردند. Jimenz و همکاران (۲۰۱۱) نیز مقادیر رطوبت، چربی، کربوهیدرات، پروتئین و برای زرشک کشور بولیوی (*B. boliviana* L) به ترتیب ۵۶/۳۰، ۰/۵۲، ۴۰ و ۹/۹۴ درصد بدست آوردند. بین میزان اسیدیته و قندهای احیاکننده هر سه واریته اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) وجود داشت. ژنوتیپ نوشین دارای بالاترین قند احیاکننده و در نتیجه دارای مزه شیرین‌تری نسبت به دو واریته دیگر بود. مقادیر ماده جامد برای واریته نوشین ۲۱/۰۶ درصد، برای واریته نگارین

و همکاران (۱۳۹۰) اثر ۴ تاریخ برداشت را بر شاخص‌های کمی و کیفی زرشک بی‌دانه مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که میزان pH، ماده جامد و آنتوسیانین‌ها به ترتیب بین ۲/۹۳-۳/۱۴، ۱۹/۳-۱۵/۹۶ درصد ماده جامد و ۲۰۰-۴۵۰ میلی‌گرم/لیتر متغیر بودند. به علت متفاوت بودن رنگ سه ژنوتیپ، بین فاکتورهای رنگی آنها اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) وجود داشت (شکل ۱). ژنوتیپ نوشین دارای کمترین مقدار روشنایی (L^*)، و بالاترین مقدار قرمزی (a^*) در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر بود. مقادیر اشیاعیت به ترتیب ۱۷/۷۲، ۴/۷۷ و ۳/۸۳ برای ژنوتیپ‌های نوشین، نگارین و پرچین محاسبه شدند. Jimenz و همکاران (۲۰۱۱) فاکتورهای رنگی L^* ، a^* و b^* را برای زرشک کشور بولیوی (B. boliviana L) به ترتیب ۳۳/۲۶، ۰/۱۹، ۰/۹۰ - به دست آوردند.

میزان برخی از عناصر معدنی سه ژنوتیپ زرشک در جدول ۴ آورده شده است. پتاسیم ماده معدنی شاخص در هر سه ژنوتیپ بود. فقط در میزان سدیم در بین سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) وجود داشت. ژنوتیپ نوشین و پرچین در میزان پتاسیم، کلسیم، منیزیم، مس و روی اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) نشان ندادند. Sood و همکاران (۲۰۱۰) میزان سدیم، پتاسیم، کلسیم و آهن زرشک کاسمال B. lycium را به ترتیب ۱۴/۵، ۱۶۱/۴۲، ۲۵/۹۷ و ۲/۶۱ میلی‌گرم در گرم بدست آوردند که مقایسه آنها با مقادیر املاح زرشک‌های بومی ایران نشان‌دهنده غنی‌تر بودن زرشک‌های بومی ایران از املاح معدنی است.

میزان منیزیم برای ژنوتیپ نوشین، نگارین و پرچین به ترتیب ۱۳/۶۵، ۱۷/۹۰ و ۱۱/۸۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. Andola و همکاران (۲۰۱۱) میزان منیزیم، روی و مس را برای زرشک‌های B. asiatica، B. arisitata، B. lyceum به ترتیب ۱/۱، ۱/۱ و ۱/۶۷، ۴/۱۸، ۱/۳۵، ۳/۴ و ۴/۵ و ۷/۲ میلی‌گرم در گرم محاسبه کردند. در مناطق مختلف دنیا میوه‌های وحشی بعنوان منابع خوبی از مواد معدنی برای افراد بومی محسوب می‌شوند (Andola et al., 2011). مقدار کلسیم و پتاسیم در ژنوتیپ‌های زرشک به مقادیر آنها در میوه‌های غنی از این عناصر نظیر خرما خشک با ۸۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کلسیم (Al-Farsi et al., 2005) و سیب با ۸۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پتاسیم (Gorinstein et al., 2001) بود. سدیم که برای تنظیم فشار خون، حفظ تعادل سیالات بدن و کارایی مناسب ماهیچه‌ها و اعصاب ضروری است نیز در مقادیر نسبتاً بالایی در واریته‌های زرشک مشاهده شد. با توجه به نیاز جوانان به ریز مغذی‌های منیزیم (۵-۲ میلی‌گرم در روز)، روی (۱۵ میلی‌گرم در روز) و مس (۳-۱۲ میلی‌گرم در روز) (Andola et

۲۲/۲۳ درصد و برای واریته پرچین ۱۹/۳۵ درصد بدست آمد. ژنوتیپ پرچین دارای بیشترین مقدار آنتوسیانین و بعد از آن ژنوتیپ نگارین و نوشین قرار داشتند. بین مقادیر آنتوسیانین سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) وجود داشت. Novruzov و همکاران (۱۹۹۴) میزان آنتوسیانین‌های ۷ گونه زرشک آذربایجان را مورد بررسی قرار دادند. در بین ۷ گونه B. nummularia دارای کمترین (۸۳۵/۳ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و B. integerrima دارای بیشترین (۳۵۱۲ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) میزان آنتوسیانین بودند. Ozgen و همکاران میزان آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنلی ۶ نوع زرشک وحشی کشور ترکیه را ۸۰۳/۶-۵۰۶/۷ میلی‌گرم/لیتر و ۳۶۲۹-۲۵۱۲ میلی‌گرم/لیتر بدست آوردند. فرهادی و همکاران میزان آنتوسیانین‌ها و فنل کل زرشک سیاه (Berberis cratagina) را به ترتیب ۴۶۸۴/۰۴ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰/۶۰ گرم در لیتر گزارش کردند. در مقایسه با گونه‌های زرشک وحشی سایر کشورها، این سه ژنوتیپ حاوی مقادیر بیشتری از آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنلی هستند. بین ترکیبات فنلی هر سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ($P < 0.05$) وجود داشت. مقادیر ترکیبات فنلی به ترتیب ۹/۷۵ گرم در لیتر برای ژنوتیپ نوشین، ۱۲/۳۵ گرم در لیتر برای ژنوتیپ نگارین و ۱۰/۹۵ گرم در لیتر برای ژنوتیپ پرچین بدست آمد. با توجه به نتایج خصوصیات شیمیایی می‌توان نتیجه گرفت که زرشک‌های وحشی در مقایسه با سایر میوه‌ها نظیر توتسیاه ۴۰/۷۷ میلی‌گرم در لیتر آنتوسیانین و ۱/۵۴ گرم در لیتر فنل کل (Wang & Xu, 2007)، تمشک ۲۰۲/۲۷ میلی‌گرم در لیتر آنتوسیانین و ۰/۸۵ گرم در لیتر فنل کل (Patras et al., 2009) و شاتوت ۱۶۴ میلی‌گرم در لیتر آنتوسیانین و ۴/۵ گرم در لیتر فنل کل (Hojjatpanah et al., 2011) منابع غنی‌تری از آنتوسیانین بوده و قابلیت استفاده بعنوان رنگ طبیعی را دارا می‌باشند. علاوه بر این با توجه به خواص سلامت بخش آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنلی از قبیل کاهش خطرات بیماری‌های قلبی و جلوگیری از سرطان که اخیراً مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Wrolstad et al., 2004) زرشک‌ها (به ویژه انواع وحشی) با توجه به غنی بودن از این مواد بعنوان میوه سلامت بخش، مطرح می‌باشند.

علت تفاوت خصوصیات شیمیایی در بین این سه ژنوتیپ می‌تواند مربوط به متفاوت بودن واریته، شرایط آب و هوایی و یا میزان رسیدگی باشد. Arena و Curvetto (۲۰۰۹) میزان ترکیبات شیمیایی زرشک آرژانتین (B. buxifolia) را طی فرایند رسیدن (۷۰ روز) مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از آن بود که مقدار pH (۲/۹۳-۳/۱۴)، ماده جامد (۲۴/۸۸-۹/۳۸) و آنتوسیانین (۷۶۱/۳۰-۸۰/۶۰ میلی‌گرم/لیتر) طی دوره رسیدگی افزایش یافتند ولی مقدار اسیدیته کاهش (۲/۵۶-۳/۸۸) یافت. Keller و Hrazdina (۱۹۹۸) بیان کردند که شرایط محیطی بر روی میزان قند و آنتوسیانین انگور تاثیرگذار است. فلاحی

al., 2011) مصرف ۱۵۰-۱۰۰ گرم زرشک یا عصاره آن در روز می‌تواند بخش اعظمی از نیاز به این عناصر را تامین نماید.

جدول ۳- خصوصیات شیمیایی سه ژنوتیپ زرشک

پرچین	نگارین	نوشین	خصوصیات شیمیایی
۶۷/۴۸±۱/۵۴۳	۷۲/۱۵±۰/۹۶۲ ^b	۶۷/۰۴±۰/۸۶۳ ^{۱a}	رطوبت(درصد)
۲/۰۴±۰/۱۲۳ ^a	۲/۳۴±۰/۲۵۴ ^a	۲/۷۰±۰/۲۵۴ ^a	چربی(درصد)
۳/۸۲±۰/۳۹۶ ^a	۵/۲۵±۰/۹۵۹ ^b	۴/۳۲±۰/۱۴۱ ^a	پروتئین(درصد)
۲۱/۶۸±۲/۰۳۱ ^a	۲۳/۷۲±۲/۴۴۰ ^a	۲۳/۹۷±۲/۲۷۰ ^a	کربوهیدرات(درصد)
۰/۹۴±۰/۰۱۴ ^a	۱/۲۱±۰/۰۸۴ ^b	۱/۲۷±۰/۰۲۱ ^a	خاکستر(درصد)
۱۹/۳۵±۰/۰۷۱ ^a	۲۲/۲۳±۰/۰۹۸ ^b	۲۱/۶۰±۰/۱۴۱ ^c	ماده جامد محلول
۲/۸۱±۰/۰۰۷ ^a	۲/۶۴±۰/۰۰۷ ^b	۲/۸۰±۰/۰۱۴ ^a	pH
۴/۱۳±۰/۰۰۹ ^a	۵/۰۶±۰/۱۳۲ ^b	۴/۷۴±۰/۰۰۱ ^c	اسیدیته (گرم اسید مالیک بر ۱۰۰ گرم)
۵/۴۲±۰/۲۱۲ ^a	۳/۳۷±۰/۱۹۶ ^b	۸/۰۳±۰/۲۳۲ ^c	قندهای حیاکننده(گرم/۱۰۰گرم)
۳۷/۱۳±۰/۲۷۶ ^a	۲۹/۳۵±۰/۳۲۵ ^b	۲۵/۹۴±۰/۶۵۷ ^c	L*
۱/۴۳±۰/۰۰۷ ^a	۴/۴۶±۰/۰۷۰ ^b	۱۷/۵۱±۰/۴۱۰ ^c	a*
۳/۵۶±۰/۰۵۶ ^a	۱/۶۸±۰/۰۴۹ ^b	۲/۷۴±۰/۱۹۰ ^c	b*
۳/۸۳±۰/۰۴۹ ^a	۴/۷۷±۰/۰۸۴ ^b	۱۷/۷۲±۰/۴۳۴ ^c	اشباعیت
۳۹۲۷/۶۰±۱۱۳/۳۵ ^a	۱۷۴۶/۹۰±۶۹/۲۴ ^b	۹۵۰/۱۷±۸۷/۳۷ ^c	آنتوسیانین(میلی گرم / لیتر)
۱۰/۹۵±۰/۷۰۷ ^a	۱۲/۳۵±۰/۷۷۷ ^b	۹/۷۵±۰/۲۱۲ ^c	فنل کل

۱- اعداد جدول بصورت میانگین ± انحراف استاندارد داده‌ها

۲- میانگین دارای حروف مشترک دارای اختلاف آماری معنی‌داری نیستند (P<۰/۰۵)

جدول ۴- میزان املاح معدنی سه گونه زرشک

پرچین	نگارین	نوشین	عناصر معدنی (میلی گرم/کیلوگرم)
۲۲۶/۹۲±۵/۳۳ ^a	۱۴۵/۰۹±۷/۱۹ ^b	۳۹۰/۶۰±۷/۴۱ ^c	سدیم
۸۷۶/۷۵±۱۰/۷۰ ^a	۸۱۲/۸۰±۸/۶۲ ^b	۸۸۹/۵۵±۵/۰۹ ^a	پتاسیم
۷۹۰/۵۰±۷/۲۱ ^a	۸۵۶±۱۲/۷۲ ^b	۷۸۵/۰۵±۷/۱۵ ^a	کلسیم
۷۲/۸۵±۳/۵۳ ^a	۷۷/۹۵±۰/۱۹۸ ^a	۹۵/۳۰±۴/۱۳ ^b	آهن
۱۱/۸۰±۰/۸۰۶ ^a	۱۷/۹۰±۰/۵۶۵ ^b	۱۳/۶۵±۰/۲۱۲ ^a	منیزیم
۱۰/۱۰±۰/۴۹۴ ^a	۲۳/۱۵±۰/۱۹۸ ^b	۱۰/۵۵±۱/۳۳ ^a	مس
۲۲/۳۰±۰/۷۰۷ ^a	۳۷/۲۵±۰/۰۹۸ ^b	۲۴/۴۰±۱/۳۶ ^a	روی

۱- اعداد جدول بصورت میانگین ± انحراف استاندارد داده‌ها

۲- میانگین دارای حروف مشترک دارای اختلاف آماری معنی‌داری نیستند (P<۰/۰۵)

نتیجه‌گیری

(۰/۹۷۴-۰/۳۷۰) نشان داد. میزان بالای چربی، پروتئین، کربوهیدرات، خاکستر در بین ژنوتیپ‌های زرشک را می‌توان به وجود هسته در این ژنوتیپ‌ها نسبت داد. ژنوتیپ نوشین دارای بالاترین قند احیاکننده و در نتیجه دارای مزه شیرین‌تری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر بود و بین میزان اسیدیته و قندهای احیاکننده هر سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵) وجود داشت. مقادیر بالای آنتوسیانین و ترکیبات فنلی در هر سه ژنوتیپ زرشک زرافشانی در مقایسه با سایر

در این پژوهش برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی سه ژنوتیپ زرشک بومی ایران مورد بررسی قرار گرفت. در بین خواص فیزیکی بررسی شده فقط در طول سه ژنوتیپ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵) نشان دادند. مقادیر طول میوه با سایر خواص فیزیکی نظیر عرض، ضخامت، حجم و میانگین هندسی قطر در میوه هر سه گونه همبستگی بالایی

کشورمان را گونه‌های مختلف زرشک وحشی تشکیل می‌دهند، لذا توجه بیشتر به این منابع بومی می‌تواند زمینه ساز کاربرد آنها در صنایع غذایی و دارویی شود.

میوه‌ها بیانگر خواص سلامت بخش این میوه‌های وحشی و بومی می‌باشد. هر سه ژنوتیپ غنی از مواد معدنی مورد نیاز بدن انسان نظیر پتاسیم، کلسیم، منیزیم و روی بودند. با توجه به اینکه بخش اعظمی از پوشش گیاهی نقاط کوهستانی

منابع

- آزادی، ر.، ۱۳۸۸. فلور ایران تیره زرشک. موسسه تحقیقات و جنگلها و مراتع کشور.
- باندردی، الفوکافی، م.، ۱۳۸۱. زرشکفناوری تولید و فرآوری، ناشر زبان و ادب مشهد، ۴۱-۱۸.
- رضوی، س.م. ع و اکبری، ر.، ۱۳۸۸. خواص بیوفیزیکی محصولات کشاورزی و مواد غذایی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴-۱.
- زرگری، علی، ۱۳۷۵. گیاهان دارویی جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران.
- فرهادی، م.، وریدی، م.ج. و وریدی، م.، ۱۳۹۱. بررسی برخی از خواص فیزیکی شیمیایی زرشک سیاه، همایش گیاهان دارویی و فرآورده‌های طبیعی دانشکده علوم پزشکی بجنورد.
- فرهادی، م.، وریدی، م.، وریدی، م. و علی حیدری، ۱۳۹۲. اندازه گیری ترکیبات شیمیایی و املاح معدنی هسته و میوه دو گونه زرشک وحشی خراسان شمالی، بیست و یکمین کنگره علوم و صنایع غذایی ایران- شیراز.
- فلاحی، ج.، رضوانی مقدم، پ. و نصیری محلاتی، م.، ۱۳۸۹. اثر تاریخ برداشت بر شاخص های کمی و کیفی میوه زرشک بی دانه، مجله پژوهشهای زراعی ایران، ۸، ۲۳۴-۲۲۵.
- ولایتی، الف.، عمادی، ب.، خجسته‌پور، م. و سعیدیراد، م. ح.، ۱۳۹۰. اثر محتوای پروتئین بر برخی خواص فیزیکی زرشک، نشریه ماشین های کشاورزی، ۱، ۹-۱.
- Abalone, R., Cassinera, A., Gasto, N.A., & Lara, M A., 2004, Some Physical Properties of Amaranth Seeds. *Biosystems Engineering*, 89: 109–117.
- Ahrendt, L., 1961, Berberis and Mahonia, a taxonomical revision. *Bot J Linn Soc*, 57:401–410.
- Akbulut, M., Calisir, S., Marakoglu, T., & Coklar, H., 2009, Some physico-mechanical and nutritional properties of barberry (*Berberis vulgaris* L.) fruits. *Journal of Food Process Engineering*, 32:497-511.
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., and Shahidi, F., 2005, Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 53:7592–7599.
- Allen, S.E., 1989, Chemical analysis of ecological material, 2nd ed London: *Blackwell Scientific Publications*, 353-379.
- Andola, H.C., Rawal, R.S., & Bhatt, I.D., 2011, Comparative studies on the nutritive and anti-nutritive properties of fruits in selected Berberis species of West Himalaya, India. *Food Research International*, 44: 2352–2356.
- AOAC., 2005. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, Vol. II. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- Arena, M.E. & Curvetto, N., 2008, Berberis buxifolia fruiting: Kinetic growth behavior and evolution of chemical properties during the fruiting period and different growing seasons. *Scientia Horticulturae*, 118:120–127
- Calisir, S., & Aydin, C., 2004, Some physico-mechanic properties of cherry laurel (*Prunus lauracerasus* L.) fruits. *Journal of Food Engineering*, 65: 145–150.
- Clifford M N., 2000, Anthocyanins nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1063-1072.
- Fatehi, M., Saleh, T. M., Fatehi-Hassanabad, Z., Farrokhfal, K., Jafarzadeh, M., and Davodi S., 2005, A pharmacological study on Berberis vulgaris fruits extract. *Journal of ethnopharmacology*, 102: 46-52.
- Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Folta, M., Barton, H., Piotrowicz, J., Zemser, M., Weisz, M., Trakhtenberg, S., and Martin-Belloso, O., 2001, Comparative contents of dietary Fiber, total phenolics, and minerals in Persimmons and Apples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 952–957.
- Hojjatpanah, G., Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., 2011, Effects of heating method and conditions on the quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 956–962.
- Indrayan, A. K., Sharma, S., Durgapal, D., Kumar, N., and Kumar, M., 2005, Determination of nutritive value and analysis of mineral elements for some medicinally valued plants from Uttaranchal. *Current Science*, 89: 1252–1255.

- Işıkli, D.I., & Yılmaz, İ., 2011, Some physical properties of sun-dried Berberis fruit (*Berberis crataegina*). *Journal Food Science Technology*, 10: 1-7.
- Jiménez, C. D., Flores, C. S., He, J., Tian, Q., Schwartz, S. J., 2011, Characterisation and preliminary bioactivity determination of *Berberis boliviana* Lechler fruit anthocyanins. *Food Chemistry*, 128: 717-724.
- Keller, M., & Hrazdina, G., 1998, Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *American Journal Enology Viticulture*, 49: 341-349.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E., 2002, Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: comparison of two pretreatments. *Journal of Food Science*, 67: 1660-1667
- Maskan, M., 2006, Production of pomegranate (*Punicagranatum L.*) juice concentrate by various heating methods: color degradation and kinetics. *Journal of Food Engineering*, 72: 3218-224.
- Mazucca, M. M., Rost, S.A.; E., Balzaretto, V.T., 2005, Fatty acids and sterols in seeds from wild species of berberis in Argentine Patagonia. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, 93: 241-246.
- McCabe, W.L., Smith, J.C. & Harriott, P., 1986, Unit operations of chemical engineering. New York: McGraw-Hill.
- Mohsenin, N.N., 1978, Physical properties of plant and animal materials. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- Novruzov, E.N., 1994, Anthocyanins in some species of the genus *Berberis L.* growing in Azerbaijan. *Institut Botaniki V.L. komarova, Baku, Azerbaijan*, 30: 73-78.
- Özgen, M., Saraçolu, O. & Geçer, N.O., 2012, Antioxidant Capacity and Chemical Properties of Selected Barberry (*Berberis vulgaris L.*) Fruits. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 53: 447-451.
- Patras, A., Brunton, N.P., Pieve, S.D. & Butler, F., 2009, Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 308-313.
- Rangana, S. C., 1979, Manual of analysis of fruit and vegetable products. New Delhi: Tata McGraw Hill Publishing Co. Ltd.
- Razavi, S.M.A., Emadzadeh, B., Rafe, A. & Amini A. M., 2007, The physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety: Part I. Geometrical properties. *Journal of Food Engineering*, 81: 209-217.
- Shahverdi, A.R., Moradkhania, R., Mirjanian, R., Alimirzaee, P., Hamid, M.I., Esfahanib, M.R. & Goharid. A.R., 2007, Enhancement Effect of *Berberis vulgaris var. integerrima* Seeds on the Antibacterial Activity of Cephalosporins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3: 181-186.
- Sood, R., P. modgil, R. & sood, M., 2010, Physicochemical and nutritional evaluation of indigenous wild fruit *Kasmal Berberis lycium Royle*. *Indian Journal of natural products and resoueces*, 1: 362-366.
- Standard Institute and Industrial Researches of Iran. 1991. Fruit juice- specifications. Standard No: 2685.
- Topuz, A.T., Topakci, M., Canakci, M., Akinci, I. & Ozdemir, F., 2005, Physical and nutritional properties of four orange varieties. *Journal of Food Engineering*, 66: 519-523.
- Vursavus, K., Kelebek, H. & Selli, S., 2006, A study on some chemical and physico-mechanic properties of three sweet cherry varieties (*Prunus avium L.*) in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 74: 568-575.
- Wang, W.D. & Xu, S.Y., 2007, Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82: 271-275.

Comparative Study on Some Physical and Chemical Properties of Three Native Seed *Berberis* Genotypes from Semnan Province

M. Farhadi Chitgar¹, M. Varidi^{2*}, M. J. Varidi³, A. Balandari⁴

Received: 2014.03.25

Accepted: 2014.07.21

Introduction: Extensive researches into native plants as a source of functional food have been conducted over the recent years. Meanwhile, barberry has been utilized as one of the main medicinal plants in Iran and many other countries, from the past decades. Currently, it has been known pharmaceutical active ingredients like berberin have wide application in pharmaceutical industry. The genus of *Berberis* includes about 450–500 species of deciduous or evergreen shrubs in which four species *B.integerrima*, *B.crataegina*, *B.vulgaris* and *B.orthobotrys* are found in Iran. Iran is the first largest producer of barberry (*B.vulgaris*) in the world. Apart from that, other species in different parts of Iran grow in wild conditions. *B. Integerrima* is a thorny shrub with fragile branches to a height of 1 to 3 meters. Its fruits are small and red with a mild sour taste. There are 1-4 small oblong seeds inside. The changes in this species are important and can produce hybrid with other species. *B. Integerrima* fruits are consumed fresh or used in the preparation of traditional foods. Barberry fruit, which contains large amount of anthocyanins, can be used as an alternative to synthetic colorants. In addition, aqueous extract of barberry has beneficial effects on both cardiovascular and neural system suggesting a potential use for treatment of hypertension, tachycardia and some neuronal disorders, such as epilepsy and convulsion. The physical properties of barberry genotype are important to design the equipment for sorting, transportation, separation, processing and packaging. Identification of the chemical characteristics of *Berberis* genotype can lead in using them in the pharmaceutical or food industries. Therefore, in order to introduce these native species, physicochemical characteristics of three wild barberries were evaluated

Materials and method:

Three native seed genotypes from Semnan province were manually collected from Research Institute of Food Science and Technology (Mashhad). The harvested fruits were instantly stored inside ice box to minimize damages and transported to the laboratory. Over ripened and damaged fruits were separated. Some physical properties (size, geometric mean diameter, sphericity, area, mass and the weight ratio of seeds to fruit) of fruits were determined using 100 repetitions at the natural moisture content of fruits. Chemical properties of samples were determined as follows: total anthocyanin content by the pH differential, total phenolic content by modified Folin–Ciocalteu method, mineral elements amounts such as Potassium(K), Sodium (Na) and Calcium (Ca) by Flame Photometer and microelements (Fe, Cu, Mg, and Zn) by Atomic Absorption Spectrophotometer, Moisture, crude oil, crude protein, ash, reducing sugar, water-soluble extract, pH and acidity were determined according to Indrayan *et al*, 1989 and Iranian National Standard No. 2685. All experiments (except physical properties) were repeated at least three times and results were expressed as mean \pm SD. The significant differences between mean values of juice samples were determined by analysis of variance (one way-ANOVA) using Duncan's test at a significance level of $p < 0.05$. Data analysis was performed using the SPSS 19.0 software.

Results and Discussion: Results showed that in physical properties such as, fruit length there was statistically difference between genotypes. The number of seeds in the three genotypes varied between 1 and 4 numbers. The weight ratio of seeds to fruit was 11.88%, 10.84% and 10.68 in Noshin, Negarin and Parchin genotypes, respectively. All three genotypes contained high amount of protein, total carbohydrate, fat and ash (3.82-5.255%, 21.68-23.97%, 2.04-2.70% and 0.94-1.27%). Noshin contained the highest reduced sugar (8.03 \pm 0.222). So, it is sweeter taste than others. In accordance with result, the amount of anthocyanins (950.17-3927.60mg/L) and total phenol (9.75-12.35gr/L) were higher than these fruits in comparison to the other fruits like mulberry and blueberry that represents the health benefits of these wild plants. All the three genotype

1, 2 And 3- Former MSc Student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Assistant Professor, Research Institute of Food science and Technology, Mashhad, Iran.

(*Corresponding author: m.varidi@um.ac.ir)

emerged as good source of minerals, especially K, Ca, Mg and Zn.

Keywords: Anthocyanins, Barberry, Physical and Chemical Properties

اثر غلظت‌های مختلف لستین - کلسترول بر خصوصیات اندازه ذرات، پتانسیل زتا، کارایی و

پایداری درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین A پالمیتات

بابک قنبرزاده^{*}، اکرم پزشکی^۲، حامد همیشه کار^۳، محمد مقدم^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۱۳

چکیده

درون پوشانی ترکیبات آب‌گریز از جمله ویتامین‌های محلول در چربی در ساختارهای لیپوزومی، روشی بالقوه مؤثر جهت حفظ آنها در برابر واکنش‌های مخرب در طی دوره‌ی نگهداری، معرفی شده است. از جمله مزایای بالقوه‌ی لیپوزوم‌ها، امکان درون پوشانی هر سه دسته مواد محلول در آب، محلول در چربی و ترکیبات آمفی‌فیل و به‌کارگیری مواد طبیعی غذایی با اثرات مفید درمانی مانند لستین در تولید آنهاست. در این پژوهش، به تعیین ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات تولید شده به روش هیدراسیون لایه‌ی نازک و به کمک امواج فراصوت و با استفاده از غلظت‌های متفاوت لستین-کلسترول (شامل ۶۰-، ۵۰-، ۴۰-، ۳۰- و ۳۰- میلی‌گرم) پرداخته شده است. بمنظور تعیین خواص کاربردی نمونه‌ها، آزمون‌های تعیین اندازه و توزیع اندازه‌ذرات، پتانسیل زتا، بررسی ریزساختار، کارایی درون پوشانی و پایداری نانولیپوزوم‌ها در طی مدت نگهداری انجام گردیدند. اندازه‌ی ذرات در محدوده ۷۶-۱۱۵ نانومتر و توزیع اندازه‌ی ذرات باریک و تک‌مد (اسپن = ۰/۸۸ - ۰/۶) بود. افزودن کلسترول اثر معنی‌داری بر اندازه‌ی ذرات نشان نداد ولی مقادیر زیاد کلسترول موجب کاهش کارایی درون پوشانی گردید. با ورود کلسترول و هم‌چنین ویتامین به ساختار نانولیپوزوم، پتانسیل زتا از ۲۹- به ۵۸- میلی‌ولت افزایش یافت که نشان‌دهنده‌ی بهبود پایداری الکترواستاتیک نانولیپوزوم‌ها بود. در کل، غلظت ۵۰ به ۱۰ میلی‌گرم لستین به کلسترول، به‌عنوان غلظت مناسب در تولید فرمولاسیون بهینه نانولیپوزوم‌ها با توزیع ذره یکنواخت و تک‌مد (اسپن = ۰/۷۴) و کارایی درون پوشانی ۱۵/۸٪ شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: نانولیپوزوم، ویتامین A پالمیتات، درون پوشانی، پایداری فیزیکی

مقدمه

و همکاران، ۲۰۱۰؛ فتحی و همکاران، ۲۰۱۲). حالیت بسیار پایین ویتامین‌های محلول در چربی از جمله ویتامین A، در محیط‌های آبی مانند نوشیدنی‌ها و ناپایداری آنها در حضور عوامل مخرب محیطی (مانند ترکیبات اکسید کننده، فلزات سنگین، ترکیبات تولید کننده رادیکال آزاد و نور) مهمترین موانع در غنی‌سازی مواد غذایی با این گروه از ویتامین‌ها است. در سال‌های اخیر، استفاده از نانوانکپسولاسیون راهکاری مفید در رفع بسیاری از دشواریهای غنی‌سازی مواد غذایی تشخیص داده شده است و می‌توان با وارد کردن این اجزاء در نانو حامل‌ها، قابلیت پخش‌پذیری، پایداری در مواد غذایی و بدن، کنترل رهایش در ماده غذایی و هم‌چنین دسترسی زیستی ترکیبات آب‌گریز را بهبود بخشید. (یانگ و همکاران، ۲۰۱۲؛ روآ و مکلمنتز، ۲۰۱۲). از مهم‌ترین نانوحامل‌های بر پایه‌ی لیپید، می‌توان به نانوامولسیون، نانولیپوزوم، نیوزوم، فیتوزوم، نانوکریستال‌های چربی (SLN)^۶ و حامل لیپیدی نانو ساختار (NLC)^۷ اشاره کرد

امروزه کاهش چربی در رژیم غذایی سبب کمبود مواد مغذی ضروری مورد نیاز بدن مانند انواع ویتامین‌های محلول در چربی، اسیدهای چرب ضروری و آنتی‌اکسیدان‌ها شده و این موضوع، لزوم غنی‌سازی محصولات غذایی کم چرب را با مواد مغذی چربی دوست نشان می‌دهد. از طرفی طی سال‌های اخیر، علاقه‌مندی مصرف کنندگان و تولیدکنندگان برای توسعه غذاهای فراسودمند حاوی مواد غذا-دارو (نوتریسیوتیکال)^۵ و زیست فعال افزایش یافته است (دووست

۱- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشجوی دکتری، مهندسی علوم و صنایع غذایی، گرایش شیمی مواد غذایی، دانشگاه تبریز

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز

۴- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* - نویسنده مسئول: (Email: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir)

(Lipoid) (Sigma، آلمان)، کلسترول با خلوص ۹۵٪ و سایر مواد شیمیایی از شرکت مواد شیمیایی مرک (Chemical Co. Merck Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

روش‌ها

روش تهیه نانولیپوزوم حاوی ویتامین A پالمیتات

تهیه نانولیپوزوم ویتامین A پالمیتات، با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت و غلظت‌های مناسب لستین- کلسترول انجام شد. ابتدا لستین و کلسترول، در الکل ۹۹٪ حل شده و سپس توسط اواپراتور خشک شد. لایه لیپیدی خشک شده در محیط آبی مجدداً آبدی شده و سوسپانسیون ایجاد شده مدتی هم زده شد (آبگیری-آبدی)^۲. به دلیل حضور آب در لایه فسفولیپید، فشار اسمزی ایجاد شده آب را به درون هریک از غشاء‌های دو لایه‌ای رانده و باعث جداسازی فیلم لیپیدی و در نهایت تولید لیپوزوم‌ها گشت. در این روش مخلوطی از انواع لیپوزوم‌های نوع MLVs^۳ و SUVs^۴ تولید شد و در ادامه کاهش اندازه‌ی ذرات با استفاده از هموژنیزاتور با نیروی برشی بالا و انرژی فراصوت با استفاده از اولتراسوند پروب صورت گرفت که در مرحله‌ی کاهش اندازه با استفاده از پروب سونیکاتور، نمونه‌ها در حمام یخ قرار گرفتند تا انرژی بیش از حد تولید شده امواج صوتی، منجر به سیالیت غشای لیپوزومی و تخریب آن نگردد. همچنین جهت جلوگیری از شکستن غشای لیپوزوم‌ها از ۱۰ سیکل یک دقیقه‌ای با فاصله استراحت یک دقیقه ما بین سیکل‌ها استفاده شد تا نانوذرات به‌وجود آمده فرصت شکل‌گیری مجدد داشته باشند. موقعیت پروب در داخل محلول نیز که از دیگر پارامترهای موثر است؛ نزدیک به سطح محلول قرار داشت تا تمامی ذرات بطور یکنواخت تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفته و در مقیاس نانو کوچک شوند، همچنین توزیع اندازه ذرات نیز همگن و تک کوهانه گردد (جوسرکا و اوروار، ۲۰۰۸).

تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه‌ی ذرات و قطر متوسط آن‌ها در دستگاه سنجش اندازه‌ی ذرات (با محدوده‌ی اندازه ذرات ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر) (SHIMADZO مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) بر اساس روش پراش استاتیک پرتو لیزر (روش SLS^۵) اندازه‌گیری شدند. آزمون پایداری ذرات نیز با اندازه‌گیری میانگین اندازه‌ی ذرات در طی نگره-داری به مدت ۳۰ روز صورت پذیرفت. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی توسط معادله (۱) محاسبه شد و کلیه نمونه‌ها در

(یوردوگول و مظفری، ۲۰۰۴؛ داس و چودهری، ۲۰۱۱). ساختار اصلی لیپوزوم‌ها از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها تشکیل می‌شود، اگرچه مواد پایدار کننده مانند استرول‌ها نیز معمولاً در ساختار آن‌ها حضور دارند. فسفولیپیدها به محض واکنش با آب بصورت سازمان یافته و به فرم غشاهای دو لایه ای تجمع می‌یابند و در اثر نیروی برشی به شکل کروی (وزیکول) در می‌آیند. نانولیپوزوم‌ها می‌توانند هر سه گروه ترکیبات آب‌دوست، آبگریز و دوگانه دوست را درون پوشانی کنند و به دلیل سازگاری، زیست تخریب پذیری و عدم حضور ترکیبات سمی، کاربردهای گوناگون در تحویل هدفمند دارو، لوازم آرایشی و صنایع غذایی دارند (کلر، ۲۰۰۱؛ تیلور و همکاران، ۲۰۰۵). در سالهای اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از نانو لیپوزوم‌ها در صنعت غذا بمنظور غنی سازی اجزای زیست فعال و توسعه‌ی غذاهای فراسودمند صورت گرفته است. از جمله مطالعات صورت گرفته می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین E و C (تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک) با کارایی درون پوشانی ۸۶٪ برای ویتامین C و ۹۹٪ برای ویتامین E (مارسنسکو و همکاران، ۲۰۱۱)، تولید لیپوزوم‌های بر پایه لستین سویا، سالمون و فسفولیپیدهای حاوی اسید چرب دکوزا هگزائوئیک اسید (PL-DHA) جهت درون پوشانی سینامیک اسید (به روش سونیکاسیون و اکستروژن) (بوراب و همکاران، ۲۰۱۴)، نانولیپوزوم‌های چند لایه‌ی حاوی عصاره پلی فنولی و آنتوسیانین هیبیسکوس بر پایه‌ی لستین سویا (به روش هموژنیزاسیون فشار بالا یا میکرو فلودایزر) (گیبیس و همکاران، ۲۰۱۴)، درون پوشانی عصاره‌ی رنگی زردچوبه در نانولیپوزوم‌های تولید شده با استفاده از لستین سویا، سالمون و شلغم روغنی (حسن و همکاران، ۲۰۱۴)، درون پوشانی ویتامین D₃ در نانولیپوزوم‌های بر پایه لستین- کلسترول (تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک و سونیکاسیون) (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲)، درون پوشانی رتینول (لی و همکاران، ۲۰۰۲) و لوتئین (ایکیسا و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به تحقیقات انجام شده نانولیپوزوم‌ها، حامل مناسبی برای غنی‌سازی مواد غذایی با ترکیبات زیست فعال آب‌گریز گزارش شده اند. بنابراین در این کار تحقیقی، به تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و کارایی درون پوشانی و همچنین پایداری آنها پرداخته شده است.

مواد و روش

مواد

ویتامین A پالمیتات، فسفولیپید (بتا استیل -وای -او - آلکیل - ال - آلفا - فسفاتیدیل کولین) با درجه خلوص بیشتر از ۹۹٪ با نام

2 Hydration-dehydration

3 Multilamellar vesicles

4 Small unilamellar vesicles

5 Static Light Scattering

1 Docosaehaenoic acid

سه تکرار اندازه‌گیری شدند. میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean (چاندا و همکاران، ۲۰۱۱):

$$\bar{D}[\xi, \nu] = \frac{\sum n_i d_i^\xi}{\sum n_i d_i^\nu} \quad (1)$$

n_i : تعداد ذرات
 d_i : قطر میانگین ذرات

شاخص پراکنش ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (همیشه‌کار و همکاران، ۲۰۰۹):

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad (2)$$

D(۹۰٪): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.
 D(۵۰٪): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).
 D(۱۰٪): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

سه تکرار اندازه‌گیری شدند.

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean (چاندا و همکاران، ۲۰۱۱):

$$\bar{D}[\xi, \nu] = \frac{\sum n_i d_i^\xi}{\sum n_i d_i^\nu} \quad (1)$$

n_i : تعداد ذرات

d_i : قطر میانگین ذرات

شاخص پراکنش ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (همیشه‌کار و همکاران، ۲۰۰۹):

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad (2)$$

D(۹۰٪): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

D(۵۰٪): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).

D(۱۰٪): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)^۱

بمنظور بررسی ریزساختار نانولیپوزوم و تایید اندازه در مقیاس نانو (کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر) از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Leo 906 مدل Zeiss 100 KV، ساخت آلمان) استفاده شد. در ابتدا یک قطره از نمونه‌ی نانولیپوزوم بهینه بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری تصویربرداری شد (کلنگ و همکاران، ۲۰۱۲).

پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A، از دستگاه زتاسایزر (Malvern-Nano-ZS انگلستان) استفاده شد. برای این منظور، هریک از نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شدند. سپس نمونه‌ها توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در pH=۷/۴ و در دمای ۲۵°C و توان ۱۴۹ وات انجام شد (فاتوروس و آنتیمیسیاریس، ۲۰۰۲).

کارایی درون پوشانی

بمنظور استخراج ویتامین A پالمیتات از نانولیپوزوم جهت بررسی کارایی درون پوشانی ویتامین، ابتدا نمونه‌ها تحت سانتریفوژ ملایم

سطح زیر منحنی حاصل از پیک نمونه، در معادله‌ی به‌دست آمده از منحنی استاندارد گذاشته شد و غلظت ویتامین کپسوله شده به‌دست آمد. بعد از روی معادله کارایی درون پوشانی (معادله ۳) درصد ویتامین درون پوشانی شده به‌دست آمد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲).

$$\text{کارایی درون پوشانی} = \frac{100 \times (\text{مقدار کل ویتامین A اضافه شده})}{(\text{مقدار ویتامین کپسوله})} \quad (3)$$

تعیین پایداری درون پوشانی نانولیپوزوم

پایداری بلند مدت نانولیپوزوم‌ها با اندازه‌گیری میانگین اندازه‌ی ذرات و میزان باقی ماندن ویتامین بارگذاری شده در داخل نانوحامل در طی نگاه‌داری ۳۰ روز در دمای یخچال بود. آزمون تعیین میزان ویتامین باقی‌مانده در نانو حامل آزمایشی در دمای ۴°C با محاسبه سطح زیرمنحنی پیک‌های حاصله از HPLC صورت پذیرفت و میزان پایداری ویتامین با استفاده از معادله‌ی ۴ محاسبه گردید (چاندا و همکاران، ۲۰۱۱).

$$\text{تعیین پایداری} = \frac{(\text{مقدار ویتامین A باقیمانده در نانوحامل})}{(\text{مقدار ویتامین A درون پوشانی شده اولیه})} \times 100 \quad (4)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم افزار آماری SPSS (version 16.0 for Windows, SPSS Inc) در

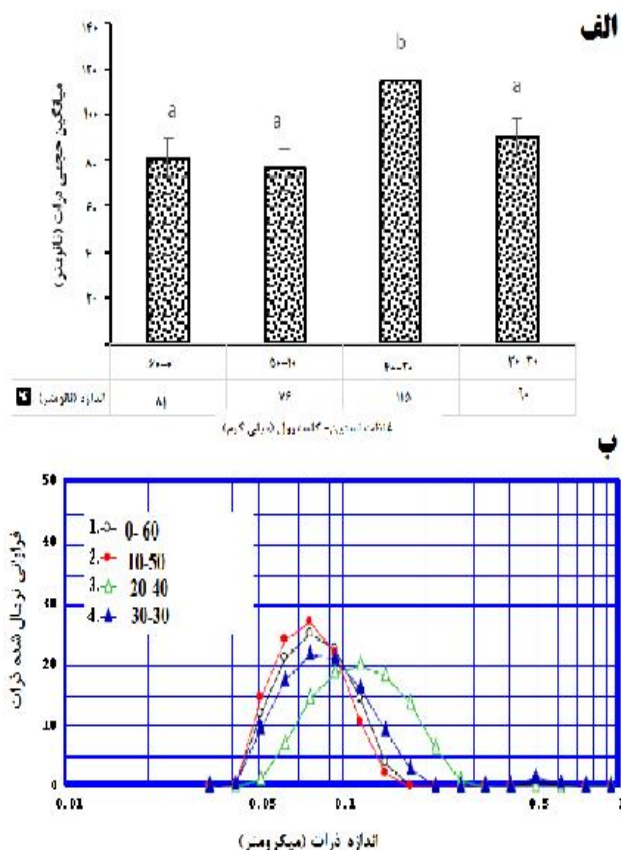
شود و مقادیر کلسترول بالاتر یا کمتر، موجب افزایش اندازه ذرات می‌شود. الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی فسفاتیدیل کولین سویا و فیتواسترول جهت درون‌پوشانی آسکوربیک اسید، گزارش کردند که افزایش غلظت فسفولیپید سویا (۱۰۰۱، ۱۵۰ و ۲۰۰)، موجب افزایش جزئی اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم (به ترتیب ۱۰۳، ۱۱۵ و ۱۳۶ نانومتر) شد. آنها همچنین گزارش کردند افزودن استرول‌های گیاهی به فرمولاسیون لیپوزوم‌ها بر اندازه ذرات تأثیری نداشت ولی منجر به توزیع اندازه‌ی ذرات باریک و تک‌مد در سیستم شد.

سطح احتمال ۵٪ ($P < 0.05$) و آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

تعیین اندازه و توزیع اندازه‌ی ذرات

اثر متغیر مستقل (غلظت‌های مختلف لسیتین به کلسترول) بر اندازه ذرات در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف لسیتین به کلسترول به‌جز غلظت ۲۰-۴۰ میلی‌گرم اثر معنی‌داری بر اندازه ذرات ندارد و افزودن کلسترول نیز تغییر معنی‌داری را در اندازه ذرات ایجاد نکرد ($p < 0.05$) (شکل ۱ الف). احتمالاً کلسترول در هنگام تبدیل ساختارهای لایه‌ای به وزیکول‌ها، در بین حفره‌های مولکولی تشکیل شده قرار می‌گیرد، در نتیجه باعث افزایش معنی‌دار در اندازه‌ی وزیکول‌ها نمی‌گردد. البته تأثیر کلسترول بر روی اندازه‌ی ذرات به روش تولید و نوع فسفولیپید مورد استفاده نیز بستگی دارد. شکل (ب) منحنی‌های توزیع اندازه‌ی ذرات نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف لسیتین- کلسترول را نشان می‌دهد. در تمامی غلظت‌های لسیتین/ کلسترول، توزیع نانوذرات بصورت یکنواخت و تک مد بود. نمونه‌های با توزیع اندازه باریک (اسپن کمتر) در برابر پدیده‌ی ناپایداری رسیدگی استوالت مقاوم‌تر هستند. از غلظت ۵۰-۱۰ میلی‌گرم لسیتین به کلسترول بعنوان نسبت مناسب از لسیتین و کلسترول برای تولید نانولیپوزوم بهینه در سایر آزمایش‌ها استفاده شد. لسیتین به‌عنوان اسکلت اصلی لیپوزوم‌ها عمل می‌کند و کلسترول باعث پایداری و تثبیت لیپوزوم‌های تشکیل یافته می‌گردد. در غشاهای لیپوزومی که غنی از لسیتین هستند، آرایش یافتن زنجیره‌های آسپیل در یک جهت، موجب کاهش فضاهای بوجود آمده‌ی در اثر گروه‌های قطبی حجیم موجود در سر لیپید، می‌شود و در نتیجه تماس و برهم‌کنش بین زنجیره‌ها بیشتر می‌شود. کلسترول، زنجیره‌های آسپیلی که به یک سمت کج شده‌اند را بصورت مستقیم و مرتب نگه می‌دارد و فضاهای ایجاد شده بین آنها را پر می‌کند (نگل و تیربسترام، ۲۰۰۰). بنابراین قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه‌ای منجر به افزایش تراکم چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود. گزارش‌های متفاوتی در مورد اثر کلسترول بر اندازه ذرات لیپوزومی منتشر شده است که به نظر می‌رسد روش تهیه لیپوزوم در آن بسیار موثر بوده است. محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D₃ به‌این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت کلسترول تأثیر معنی‌داری روی اندازه و توزیع اندازه ذرات نداشت. از طرف دیگر لیو و پارک (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای که بر روی نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C، پوشش‌دار شده توسط کیتوزان انجام دادند به‌این نتیجه رسیدند که با استفاده از نسبت‌های ۴۰:۶۰ و ۶۰:۴۰ لسیتین/کلسترول، نانولیپوزوم‌هایی با اندازه‌های کوچک ۹۷/۴ و ۹۵/۸ نانومتر تولید می‌-



شکل ۱- تأثیر تغییر غلظت لسیتین به کلسترول (میلی‌گرم)

الف: بر اندازه ذرات و ب: توزیع اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم حاوی ۲/۴ میلی‌گرم ویتامین A پالمیتات (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن).

محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در تحقیق بر روی تولید نانولیپوزوم‌های حاوی گاما‌اوریزانول (استرول گیاهی) گزارش کردند افزایش غلظت لسیتین در دامنه ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰٪ تفاوتی در اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی گاما‌اوریزانول ایجاد نکرد و افزودن گاما‌اوریزانول به عنوان یک ترکیب آگریز احتمالاً به دلیل تغییر در

بدون کلسترول و ویتامین ۲۹۷m - بود که این ممکن است به دلیل حضور فسفاتیدیل کولین و موقعیت قرارگیری اسیدچرب آن و یونیزاسیون گروه‌های فسفات و کربوکسیل باشد. تمامی لیپوزوم‌های حاوی ویتامین دارای پتانسیل زتای بالای ۴۰ v m - هستند که بیان - گر نقش نیروی دافعه‌ی الکترواستاتیک در پایداری نانولیپوزوم‌ها و جلوگیری از تجمع آنها در طول زمان است. وقتی بار کلی روی ذرات افزایش می‌یابد، ذرات همدیگر را دفع کرده و بر توده ای شدن غلبه می‌کنند. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در کنترل توده‌ای شدن و رسوب نانولیپوزوم‌ها که فاکتورهای مهم در پایداری نانولیپوزوم‌ها هستند، مفید است (مظفری و همکاران، ۲۰۰۶).

جدول ۱ - پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های بدون ویتامین و با ویتامین A پالمیتات

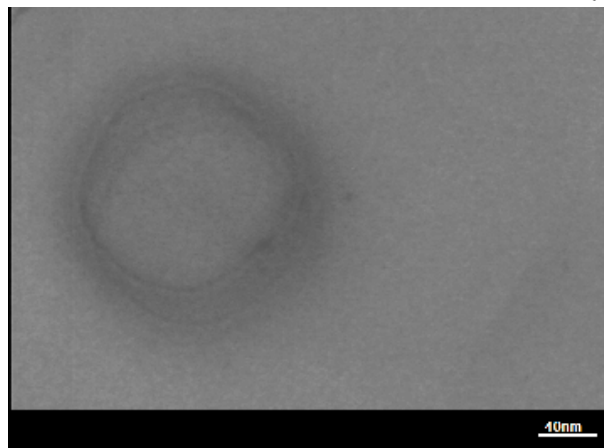
پتانسیل زتا (vm)		ترکیبات تشکیل دهنده لیپوزوم لستین به کلسترول (mg)
بدون ویتامین	با ویتامین	
-۴۵/۶	-۲۹	۰ به ۶۰
-۴۴/۵	-۳۵	۱۰ به ۵۰
-۵۸/۶	-۳۹/۷	۲۰ به ۴۰
-۴۶/۱	-۴۲/۸	۳۰ به ۳۰

از عوامل موثر بر پتانسیل زتای لیپوزوم می‌توان به نوع و مقدار فسفولیپید؛ نوع و غلظت پایدارکننده مانند کلسترول؛ نوع و غلظت ماده‌ی فعال؛ قدرت یونی محیط و دما اشاره کرد. طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، با افزایش میزان کلسترول (مولکول خنثی و بدون بار)، پتانسیل زتا در نانولیپوزوم‌های بدون ویتامین آ، افزایش می‌یابد. بر اساس مکانیسم پیشنهاد شده توسط برخی از محققین گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول با گروه کولین موجود در سر قطبی فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند و گروه کولین با بار مثبت به داخل غشا کشیده می‌شود و گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است به سطح غشا رانده می‌شود و بنابراین بار منفی افزایش و باعث دفع الکترواستاتیک ذرات می‌شود (میلر، ۲۰۰۷). در ارتباط با تأثیر کلسترول بر پتانسیل زتا نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است. محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در نتایج خود در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D₃ با استفاده از غلظت‌های متفاوت لستین و کلسترول بیان کردند که با افزایش مقدار کلسترول، پتانسیل زتا بطور تدریجی افزایش می‌یابد. ایکسیا و ایکسو (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند با اضافه کردن کلسترول تا غلظت ۱۰٪ مولی، بار منفی روی ذرات نانولیپوزوم و دافعه‌ی الکترواستاتیک آنها افزایش می‌یابد که دلیل آن را به برقراری پیوند بین گروه هیدروکسیل کلسترول و کولین

غشاء دولایه‌ای لیپیدی، منجر به کاهش اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم‌ها شد. ویریاروج و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش نمودند با استفاده از کلسترول در ساختار لستین، اندازه‌ی ذرات از ۷۲ نانومتر به ۶۳ نانومتر کاهش می‌یابد. به‌طور کلی بر اساس نتایج تحقیقات مختلف می‌توان به این نتیجه رسید که کلسترول بیشتر بر پایداری فیزیکی (پایداری اندازه ذرات) در طول زمان موثر است و تنها تأثیر اندکی بر اندازه ذرات هنگام تشکیل لیپوزوم دارد.

مورفولوژی نانولیپوزوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری

بررسی ریزساختار نانو لیپوزوم و تأیید اندازه آن در مقیاس نانو (کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر) در شکل ۲ نشان داده شده است. پس از اعمال فرایند فراصوت، اندازه وزیکول‌ها در حد نانومتر کاهش پیدا می‌کند و می‌توان از طریق میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تصاویر نانولیپوزوم‌ها را به‌صورت وزیکول‌های دایره‌ای شکل منظم با قطر متوسط حدود ۸۰ نانومتر مشاهده نمود. هم‌چنین حضور غشاء دولایه در اطراف وزیکول به خوبی مشخص است. تصاویر میکروسکوپی حاصله تأییدی بر نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میانگین حجمی ذرات در دستگاه سنجش اندازه ذرات بود. کولاس و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی مورفولوژی و ریزساختار نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین تهیه شده به روش حرارتی بوسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی TEM، گزارش کردند که با استفاده از این روش می‌توان نانولیپوزوم‌هایی با توزیع اندازه ذره‌ی باریک و اندازه‌ی کوچک تولید کرد



شکل ۲ - تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانولیپوزوم بر پایه‌ی ۱۰-۵۰ میلی‌گرم لستین - کلسترول حاوی ۲/۴ میلی‌گرم ویتامین A پالمیتات.

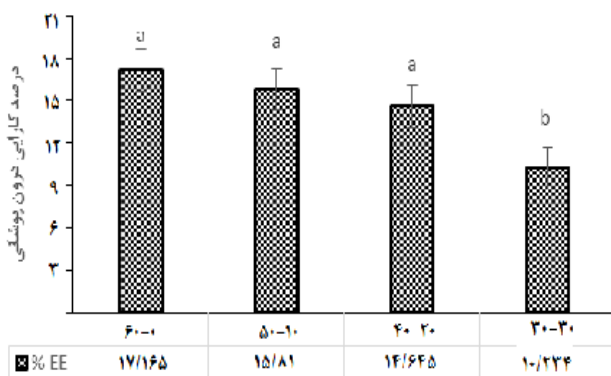
پتانسیل زتا

نتایج حاصل از پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های بدون ویتامین و با ویتامین در جدول (۱) نشان داده شده است. پتانسیل زتای نانولیپوزوم

ندرت تحت تأثیر ترکیب درون‌پوشانی شده در حامل، غلظت و شرایط افزودن ترکیب فعال در طول آماده سازی وزیکول‌ها قرار می‌گیرد.

کارایی درون‌پوشانی

در این تحقیق جهت محاسبه‌ی مقدار ویتامین A پالمیتات درون‌پوشانی شده در نانولیپوزوم‌ها، از دستگاه HPLC استفاده شد. کارایی درون‌پوشانی سیستم نانولیپوزوم، یک روز پس از تولید نمونه‌های لیپوزومی مختلف حاوی غلظت‌های لستین به کلاسترول متفاوت با محاسبه سطح زیرمنحنی پیک‌های حاصله از HPLC اندازه‌گیری و با استفاده از معادله درصد کارایی (معادله ۳) محاسبه گردید. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در تمامی غلظت‌های لستین - فسفولیپید، کارایی درون‌پوشانی نسبتاً پایینی بدست آمد. با افزایش نسبت لستین به کلاسترول، کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها افزایش یافت و استفاده از غلظت لستین به کلاسترول ۶۰-۰ بیشترین کارایی درون‌پوشانی (۱۷/۶۵٪) را حاصل نمود. فسفولیپید به عنوان اسکلت اصلی وزیکول‌های تشکیل یافته عمل می‌کند و با افزایش نسبت لستین به ماده فعال و کلاسترول که منجر به افزایش تعداد وزیکول‌ها و همچنین حجم داخلی لیپوزوم و تمرکز بیشتر ماده فعال بر روی سطح لیپید می‌شود، درصد بارگیری ترکیب فعال در ساختار لیپوزوم افزایش یافت. از طرفی، سفت شدن غشا توسط کلاسترول می‌تواند باعث جلوگیری از باز شدن غشای لیپوزومی و در نتیجه جا گرفتن کمتر مواد فعال آبریز در آن گردد. همچنین، احتمالاً حضور کلاسترول در غشای لیپوزومی، نزدیکی و مجاورت ویتامین A پالمیتات با غشای لیپوزومی را کاهش می‌دهد.



غلظت لستین - کلاسترول (میلی گرم)

شکل ۳- کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم حاوی ۲/۴ میلی‌گرم

ویتامین A پالمیتات با غلظت‌های مختلف لستین به کلاسترول

(۶۰-۰، ۵۰-۱۰، ۴۰-۲۰، ۳۰-۳۰) (حروف متفاوت نشان‌دهنده

تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن).

در همین راستا نتایج لیو و پارک (۲۰۱۰) در تحقیق بر روی نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C پوشش‌دار شده توسط کیتوزان نشان

لستین و ایجاد کشش دو قطبی بین آنها نسبت دادند. در پژوهش دیگری لیو و همکاران (۲۰۰۰)، بر تأثیر کلاسترول بر پایداری فیزیکی لیپوزوم‌های متشکله از لستین به این نتیجه رسیدند که پتانسیل زتا و دفع الکترواستاتیک بین لیپوزوم‌های فسفاتیدیل کولین با افزودن کلاسترول افزایش می‌یابد. حضور ترکیب فعال در ساختار نانوحامل یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر پتانسیل زتا است. نتایج این تحقیق نشان داد در مقایسه‌ی هر تیمار با نوع بدون ویتامین، درون‌پوشانی ویتامین، پتانسیل زتا را به مقدار زیادی افزایش داد (جدول ۱) که مطابق با یافته‌های محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در ارتباط با درون‌پوشانی ویتامین D₃ در نانولیپوزوم‌های متشکل از غلظت‌های متفاوت لستین و کلاسترول بود. برهم‌کنش بین پوشش لیپیدی و ماده‌ی فعال هسته‌ای نیز تأثیر به‌سزایی بر پتانسیل زتا و پایداری وزیکول‌ها دارد. احتمالاً ساختار ترکیب فعال با تغییر دادن ساختار سطحی لیپوزوم‌ها، موجب منفی‌تر شدن پتانسیل زتای سطحی آنها می‌شود. این تغییرات منجر به تغییر در آرایش و جهت‌گیری گروه‌های سر فسفاتیدیل کولین در سطح لیپوزوم‌ها می‌شود. وقتی ویتامین در ترکیب لستین-کلاسترول حل می‌شود و در داخل دولایه‌ی لیپیدی قرار می‌گیرد، زنجیره‌های آسیل فسفولیپیدی محیط مناسبی برای مولکول‌های ویتامین فراهم می‌کنند. ویتامین می‌تواند با غشای فسفولیپیدی واکنش دهد و باعث دوباره قرارگیری و آرایش مجدد ساختارهای لیپیدی غشا شود و از این طریق پتانسیل زتا، پایداری و دیگر خصوصیات غشا را تحت تأثیر قرار دهد. ویتامین در شرایط آزمایش یونیزه نمی‌شود و تأثیر آن در پتانسیل زتا از طریق تغییر ریزساختارهای غشاست. نتایج تحقیقات نشان داده است وقتی وزیکول‌های فسفولیپیدی یونی لاملار توسط روش سونیکاسیون آماده می‌شوند، ویتامین با غشای فسفولیپیدی پیوند برقرار می‌کند. ویتامین A نسبت به کلاسترول با سرعت بالاتری می‌تواند بین غشاهای فسفولیپیدی مبادله شود به دلیل اینکه ویتامین A نسبت به کلاسترول پیوند ضعیف‌تری با غشا ایجاد می‌کند و بنابراین پتانسیل زتا را تحت تأثیر قرار می‌دهد (میلر، ۲۰۰۷). در تطابق با این تحقیق، پاداموار و پوخارکار (۲۰۰۶) با کپسوله کردن ویتامین E در لیپوزوم‌های لستین-کلاسترول، مشاهده کردند پتانسیل زتای وزیکول‌های تولید شده افزایش یافت. محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در مطالعه خود بر روی نانولیپوزوم‌های حاوی گاما‌اوریزانول نشان دادند که افزودن گاما‌اوریزانول باعث افزایش جزئی پتانسیل زتای منفی از ۱۹/۴- به ۲۰/۴- میلی‌ولت می‌شود. البته برخی دیگر از محققین نقش ماده فعال را در افزایش مقدار پتانسیل زتا بدون تأثیر دانستند. در این راستا مورا و همکاران (۲۰۰۷)، افزایش پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های لستین-کلاسترول حاوی بنزوکینون را به یونیزاسیون گروه‌های فسفات فسفولیپید نسبت دادند و نقش ترکیب فعال را در بار منفی ذرات خنثی اعلام کردند. آنها براین عقیده بودند که پتانسیل زتا به-

به روش تزریق اتانول، نشان داد کارایی کپسول‌سیون در مقادیر کم کلاسترول افزایش می‌یابد، ولی با افزایش کلاسترول، کارایی از ۴۵٪ به ۳۶٪ و ۳۲٪ کاهش پیدا می‌کند. آنها افزایش راندمان در مقادیر کم کلاسترول را به افزایش پایداری غشای لیپوزومی به دلیل اثر کلاسترول بر کاهش سیالیت غشا نسبت دادند و کاهش کارایی در مقادیر زیاد کلاسترول را به گسیخته شدن غشای لیپوزومی در مقادیر زیاد کلاسترول نسبت دادند. همچنین، کارایی درون‌پوشانی تحت تأثیر نوع فسفولیپید نیز می‌باشد. بوراب و همکاران (۲۰۱۴) در تولید لیپوزوم‌هایی بر پایه‌ی لستین سویا، سالمون و فسفولیپیدهای دکوزا هگزائوئیک اسید (PL-DHA1) جهت درون‌پوشانی سینامیک اسید، تأثیر نوع و ترکیب فسفولیپید مصرفی را در کارایی درون‌پوشانی و نفوذپذیری غشاء و زیکول نسبت به ترکیب هیدروفوب سینامیک اسید بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد در استفاده از لستین سالمون، بیشترین کارایی درون‌پوشانی حاصل شد. آنها پیشنهاد دادند که به علت حضور اسیدهای چرب اشباع در ساختار فسفولیپید، این وزیکول‌ها از پایداری بالا و استحکام زیاد غشاء، برخوردار بودند. همچنین آنها گزارش کردند که ارتباط مستقیمی بین افزایش اندازه‌ی وزیکول نانولیپوزوم و کاهش کارایی درون‌پوشانی وجود دارد.

بررسی پایداری فیزیکی

عدم تغییر پارامترهایی از قبیل اندازه‌ی ذرات و توزیع اندازه‌ی ذرات در طی یک دوره‌ی زمانی طولانی نشان‌دهنده‌ی پایداری بودن نانوحامل تولیدی است. جهت بررسی پایداری فیزیکی از دو پارامتر اندازه‌ی ذرات و میزان باقی ماندن ویتامین بارگذاری شده در داخل نانولیپوزوم طی مدت ماندگاری ۳۰ روز استفاده شد.

بررسی پایداری اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم

شکل (۴ الف) اندازه‌ی ذرات بعد از مدت یک ماه در دمای ۴۰°C را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در نمونه‌های لستین-کلاسترول با نسبت‌های ۰-۶۰ و ۰-۴۰ و ۲۰-۳۰ بین روزهای نگهداری در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌دار وجود دارد و در نمونه‌ی ۳۰-۳۰ میلی‌گرم لستین-کلاسترول نسبت به بقیه‌ی تیمارها، افزایش بیشتری در اندازه‌ی ذرات بعد از گذشت ۳۰ روز ملاحظه می‌شود. با این وجود، هم‌چنان اندازه‌ی ذرات نزدیک به مقیاس نانو (nm) (۳۴۸) باقی ماند. در نمونه‌ی لستین-کلاسترول با نسبت ۵۰ به ۱۰ بین هیچ کدام از روزها تفاوت معنی‌دار ملاحظه نشد و نسبت به تیمارهای دیگر اندازه‌ی ذرات بعد از گذشت ۳۰ روز تقریباً بدون تغییر ماند.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پایداری نانولیپوزوم‌ها به فاکتورهای متعدد از قبیل ماهیت و غلظت فسفولیپید در سیستم؛ روش تولید

داد لیپوزوم‌های با اندازه‌ی کوچک قادر به بارگیری بیشتر ویتامین C درون خود هستند که این می‌تواند به علت حضور مقدار بیشتر نانوحامل در سیستم آنها باشد و مقادیر بهینه‌ی نسبت فسفولیپید به کلاسترول برای حداکثر بارگذاری ۶۰ به ۴۰ بود و در کمتر و بیشتر از این نسبت، مقادیر کارایی بارگذاری کاهش یافت. محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی گامااوریزانول گزارش کردند با افزایش میزان غلظت لستین و یا کاهش نسبت ترکیب فعال به لستین، کارایی درون‌پوشانی در نانولیپوزوم‌ها از ۶۰٪ تا ۸۴/۳٪ افزایش می‌یابد.

از عوامل موثر بر کارایی درون‌پوشانی لیپوزوم‌ها می‌توان به ماهیت ماده‌ی فعال (لیوفیل یا هیدروفیل بودن آن)؛ ماهیت فسفولیپید (از نظر نوع و آرایش اسیدهای چرب)؛ نسبت فسفولیپید به ماده‌ی فعال؛ روش تولید نانولیپوزوم؛ غلظت و نوع پایدارکننده مانند کلاسترول و شرایط محیطی از قبیل دما، pH و قدرت یونی اشاره کرد. گونت و همکاران در سال ۲۰۱۰، ماکزیمم غلظت ترکیبات فعال درون‌پوشانی شده در لیپوزوم‌ها را تا حد زیادی به قطبیت آنها مرتبط دانستند که موقعیت قرارگیری آنها را در غشای دو لایه‌ای مشخص می‌کرد. کاروتنوئیدهای با قطبیت کمتر، مانند بتاکاروتن و لیکوپن، در مرکز غشای دو لایه‌ای تجمع پیدا می‌کنند؛ بنابراین غلظت کمتری از این گونه ترکیبات به نانولیپوزوم‌ها ملحق می‌شود. در این تحقیق به احتمال زیاد ویتامین A پالمیتات با وزن مولکولی (۵۲۴/۹ gr/mole) به علت حضور استر پالمیتیک در ساختار خود نسبت به سایر مشتقات ویتامین A غیر قطبی‌تر بوده و همانند بتاکاروتن در مرکز غشاء فسفولیپیدی قرار می‌گیرد. بنابراین با توجه به وزن مولکولی بالا و ساختار بزرگ ویتامین A پالمیتات، تعداد مولکول کمتری از این ترکیب می‌تواند در ساختار غشای دو لایه‌ی لیپوزوم قرار گرفته و هم‌چنین به دلیل حساسیت بیش از حد ویتامین A پالمیتات به نور و اکسیژن و هم‌چنین حلال‌های آلی امکان تجزیه و تخریب آن در طی مراحل تهیه‌ی سیستم نانولیپوزوم وجود دارد که این عوامل را می‌توان توجیهی بر کارایی پایین به دست آمده در این تحقیق در نظر داشت. در همین راستا نیز نتایج سینگ و داس (۱۹۹۸) در بررسی تولید لیپوزوم‌های حاوی رتینول و رتینیل پالمیتات نشان داد این ترکیبات به غشا دو لایه‌ای وزیکول‌ها (فسفاتیدیل کولین) متصل شده و رتینیل پالمیتات با توجه به دارا بودن استر غیر قطبی توانایی کمتری جهت ترکیب شدن با عوامل قطبی فسفولیپید موجود در غشاء دارد.

در مطالعه‌ی انجام گرفته توسط لاریدی و همکاران (۲۰۰۳)، بر روی انکپسوله کردن نایسین در سیستم نانولیپوزوم نشان داده شد استفاده از کلاسترول در ساختار لیپوزوم، مانع گسیختن و تغییر غشای لیپوزومی توسط نایسین و هم‌چنین باعث کاهش کارایی کپسول‌سیون نایسین در لیپوزوم گردید. نتایج فان و همکاران (۲۰۰۸) در مورد تأثیر کلاسترول بر کارایی کپسول‌سیون نانولیپوزوم‌های حاوی سالیروسید

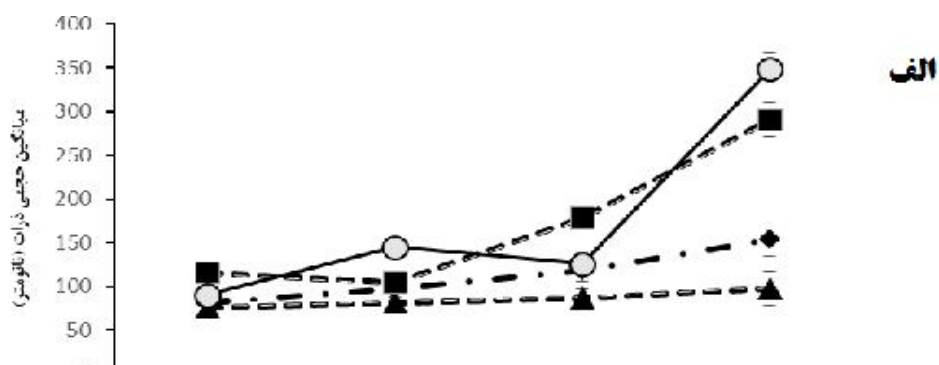
لیپوزومی می‌شود و با تضعیف پیوندهای واندروالس بین زنجیره‌های هیدروکربنی اسیدهای چرب از کریستالیزاسیون لیپوزوم جلوگیری می‌کند. درحالی‌که در فاز مایع افزودن کلسترول سیالیت و تحرک زنجیره‌های آسیل را محدود می‌سازد (لیانگ و همکاران، ۲۰۰۴).

یکی دیگر از علل پایدار بودن نسبی نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A بعد از مدت یک ماه را می‌توان به نگهداری آنها در شرایط مطلوب و مناسب نگهداری (دمای پایین 4°C) و در تاریکی نسبت داد. دما و نور منجر به تغییر در ساختار کریستالی لیپید، نرم شدن غشا و کاهش پتانسیل زتا می‌شوند و در نتیجه منجر به کاهش نیروی دفعی بین ذرات و توده‌ای شدن ذرات می‌شوند. ماده تشکیل‌دهنده غشای لیپوزومی نیز می‌تواند در پایداری فیزیکی لیپوزوم‌ها دخیل باشد. محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲)، بر روی پایداری نانولیپوزوم-های حاوی گامااوریزانول تولید شده به روش گرمایی از لحاظ تغییر در اندازه ذرات و میزان ماده‌ی کپسوله شده‌ی باقیمانده طی مدت ۶۰ روز در دمای 4°C و 25°C مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که تفاوت چشمگیری در اندازه ذرات بعد از دو ماه نگهداری در دمای 4°C مشاهده نشد و توزیع اندازه ذرات برای تمام نمونه‌ها با غلظت-های متفاوت لسیتین، باریک و تک مد بوده و سیستم حاوی ذرات نانولیپوزومی با گذشت زمان پایدار بود. همچنین از لحاظ ماده کپسوله شده باقیمانده طی مدت ۶۰ روز، نتایج نشان داد که تمامی نمونه‌های نگهداری شده در دمای 4°C با گذشت زمان پایدار ماندند. ولی در دمای 25°C هم اندازه‌ی ذرات و هم میزان نشت ماده‌ی فعال از داخل لیپوزوم‌ها افزایش یافت. در دمای 25°C لیپوزوم‌ها به دلیل سیالیت بالای غشاء، تغییر شکل داده و لخته تشکیل می‌دهند که افزایش اندازه‌ی ذرات با توزیع اندازه ذره‌ای گسترده را در پی خواهد داشت. نوع لیپید حاصل نیز بر پایداری ذرات تأثیرگذار است. در پژوهشی تامسون و همکاران (۲۰۰۶)، پایداری فیزیکی لیپوزوم‌های تشکیل شده از غشای فسفولیپیدی گلبول‌های چربی و فسفولیپید سویا را مقایسه کردند. نتایج نشان داد لیپوزوم‌های تشکیل شده از غشای گلبول‌های چربی پایداری بیشتری (از لحاظ اندازه‌ی ذرات) در گستره‌ی دمایی 35°C - 4°C ، در مقایسه با لیپوزوم‌های تولید شده از فسفولیپید سویا ایجاد می‌کند. آنها نتایج خود را این‌گونه توجیه کردند که اسفنگومیلین که جزء اصلی تشکیل‌دهنده‌ی غشای گلبول‌های چربی است در مقایسه با فسفاتیدیل کولین، محافظت بیشتری از لیپوزوم‌ها در برابر تنش‌های محیطی به عمل می‌آورد.

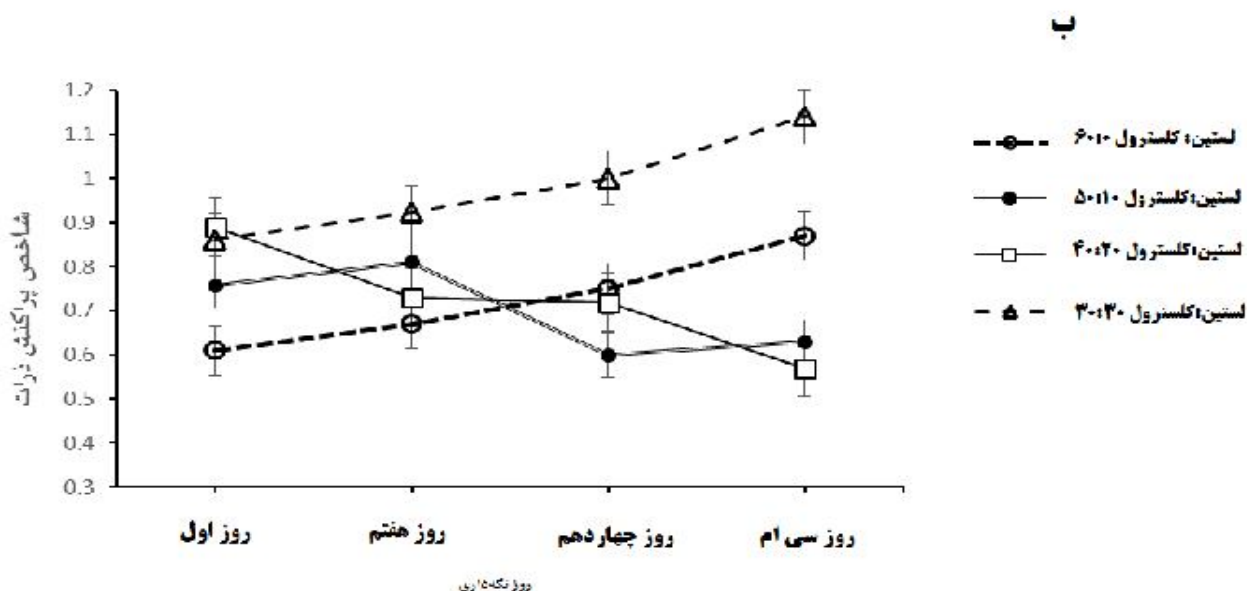
نانولیپوزوم؛ غلظت و نوع پایدارکننده (مانند کلسترول)؛ شرایط محیطی از قبیل دما، pH و قدرت یونی بستگی دارد. همچنین پایداری نانولیپوزوم‌ها تا حد زیادی وابسته به سیالیت غشاء لیپیدی است. نانولیپوزوم‌ها به دلیل تفاوت ناچیز دانسیته آن‌ها با فاز پیوسته ته‌نشین و شناور نمی‌شوند (کمتر دچار تفکیک گرانشی می‌شوند) و حرکات براونی، لیپوزوم‌ها را به صورت معلق نگه می‌دارد. در مقابل، انبوهش (فلوکولاسیون) و سپس درهم‌آمیختگی^۱ عامل اصلی ناپایداری و افزایش اندازه ذرات است. بنابراین یکی از فرایندهایی که باعث ناپایداری سیستم‌های کلوتیدی می‌شود، انبوهش ذرات طی زمان نگهداری است. نیروهای جذبی بین ذرات باعث چسبیدن آنها به هم و تشکیل ساختارهای بزرگتر می‌شود و اگر فرایندهای ته‌نشینی و شناور شدن ذرات نانولیپوزومی در زمان نگهداری سیستم لیپوزومی رخ دهد، نشان‌گر توده شدن ذرات است. در دمای محیط، لیپوزوم‌ها به دلیل سیالیت بالای غشاء، تغییرشکل داده و لخته تشکیل می‌دهند که افزایش اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات گسترده و ناهمگون را در پی خواهد داشت.

در مطالعه‌ی صورت گرفته، همه‌ی تیمارها طی ۳۰ روز نگهداری، توزیع ذرات باریک و همگن داشتند اما توزیع اندازه‌ی ذرات تیمار آخر (غلظت ۳۰-۳۰ میلی‌گرم لستین به کلسترول) در طی مدت نگهداری بصورت ناهمگون بوده و همین تیمار نیز بیشترین افزایش اندازه را نسبت به سایر تیمارها داشت. شکل (۴ ب) شاخص پراکنش ذرات (اسپن) نمونه‌های با غلظت‌های مختلف لستین به کلسترول را بعد از گذشت ۳۰ روز نشان می‌دهد.

در ارتباط با تأثیر کلسترول در پایداری ذرات می‌توان این‌طور بیان کرد که کلسترول در مقادیر بهینه با افزایش سفتی غشاء و افزایش پتانسیل زتا، موجب افزایش دفع الکترواستاتیک بین ذرات شده و از فرایند به هم‌آمیخته‌شدن جلوگیری می‌کند و موجب افزایش پایداری اندازه ذرات می‌گردد و در مقادیر بالا احتمالاً موجب گسیختگی غشاء می‌شود (بنگ و همکاران، ۲۰۱۱). گروه هیدروکسیل واقع در سر کلسترول در مجاورت گروه‌های کربونیل استر لیپیدی قرار گرفته و حلقه آگریز کلسترول، موازی با زنجیره‌های آسیل لستین قرار می‌گیرد. افزایش کلسترول منجر به افزایش سفتی ساختار و کاهش سیالیت غشا و کاهش توده‌ای شدن وزیکول‌ها می‌شود. همین عامل ممکن است منجر به افزایش دمای انتقال فاز شود (تسنگ و همکاران، ۲۰۰۷). هرچه پیوندهای هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل کلسترول و گروه کربونیل فسفولیپید افزایش یابد، پایداری دو لایه‌ای لیپیدی افزایش خواهد یافت. در فاز ژلی، افزودن کلسترول تحرک زنجیره‌های آسیل را افزایش داده و منجر به افزایش سیالیت غشای



روز نگهداری	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز سی‌ام
لستین:کلوسترول ۶۰:۴۰ (خط پیوسته دایره)	۹۰	۱۴۵	۱۲۶	۳۴۸
لستین:کلوسترول ۵۰:۵۰ (خط چین مربع)	۷۶	۸۱	۸۶	۹۷
لستین:کلوسترول ۴۰:۶۰ (خط چین مثلث)	۱۱۵	۱۰۴	۱۷۸	۲۹۰
لستین:کلوسترول ۳۰:۷۰ (خط چین الماس)	۸۱	۹۷	۱۱۸	۱۵۴



شکل ۴-الف): تأثیر زمان نگهداری بر اندازه‌ی ذرات در غلظت‌های مختلف لستین به کلوسترول نانولیپوزوم‌های حاوی ۲/۴ میلی‌گرم ویتامین A پالمیتات (حروف غیر مشابه نشان دهنده‌ی وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است) و ب): شاخص پراکنش ذرات در غلظت‌های مختلف لستین به کلوسترول نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات بعد از گذشت ۳۰ روز.

نشان داد پس از گذشت ۳۰ روز نگهداری، کاهش ۳۲ درصدی ویتامین A پالمیتات در نانولیپوزوم‌ها رخ داد. علت کاهش ویتامین در طی مدت زمان می‌تواند مربوط به انتشار و خروج ترکیب فعال از ساختار نانوحامل و همچنین تجزیه‌ی هیدرولیتیکی و اکسیداسیون آن باشد. از جمله عوامل موثر بر پایداری درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها می‌توان به ماهیت ماده‌ی فعال؛ ماهیت و مقدار فسفولیپید مورد استفاده؛ ماهیت و مقدار پایدارکننده؛ شرایط محیطی و دما اشاره کرد. در ارتباط

بررسی پایداری درون‌پوشانی (پایداری ویتامین A پالمیتات) بررسی میزان پایداری ویتامین کپسوله شده در نانولیپوزوم بهینه (غلظت ۵۰-۱۰ میلی‌گرم لستین به کلوسترول) در دمای ۴°C طی مدت یک ماه و در بازه‌های زمانی توسط دستگاه HPLC انجام شد. در جدول ۲ پایداری درون‌پوشانی محلول لیپوزومی بهینه در طی روزهای اول، دهم، بیستم و سی‌ام نگهداری ارائه شده است. نتایج

اسیدهای چرب غیر اشباع، تثبیت زنجیره‌های فسفولیپیدی را کاهش داده و تا حدی سبب هیدراسیون و حضور آب در دولایه‌ی وزیکول می‌شود و در نتیجه منجر به سیالیت و انعطاف‌پذیری غشاء می‌شود (لیکومجورن و همکاران، ۲۰۰۹؛ بوراب و همکاران، ۲۰۱۴؛ حسن و همکاران، ۲۰۱۴).

یکی دیگر از عوامل پایداری ویتامین کپسوله شده در مدت نگهداری، نگهداری فرمولاسیون در تاریکی و دور از نور و در دمای پایین است. به‌طور کلی، وزیکول‌های لیپیدی نفوذپذیری کمی نسبت به مواد محصور شده دارند. اما در دماهای بالاتر، آن‌ها متحمل تغییر فاز شده و خصوصیات نفوذپذیری آن‌ها تغییر می‌کند (فتیحی و همکاران، ۲۰۱۲). هم‌چنین افزایش دما باعث افزایش حرکات براونی لیپیدها در وزیکول‌ها شده و منجر به آرایش مجدد گروه‌های سر لیپیدی شده و به‌طور افزایشی گروه‌های فسفاتیدیل لیپوزوم‌ها در معرض محیط قرار می‌گیرند (تیلور و همکاران، ۲۰۰۵؛ تیلور و همکاران، ۲۰۰۷). محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در ارتباط با تأثیر دما بر پایداری نانولیپوزوم‌ها بیان کردند نشت بیشتر ماده‌ی فعال از وزیکول‌های نگهداری شده در دماهای بالاتر به اثر دما بر تغییر فاز ساختار دولایه‌ی لیپیدی از حالت ژل به کریستال مایع (مزوفاز) مربوط است که منجر به تجزیه‌ی شیمیایی فسفولیپیدها و نقص در چیدمان غشاء می‌شود.

کو و لی (۲۰۱۰)، بر روی پایداری نانولیپوزوم‌های حاوی رتینول تحت شرایط تاریکی و نور UV و در دماهای (۳۷، ۲۵ و ۴) تحقیقاتی انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که پایداری نانولیپوزوم‌های حاوی رتینول، تحت شرایط تاریکی افزایش می‌یابد. در رابطه با دماهای نگهداری، رتینول در دماهای بالاتر سریع‌تر تجزیه شده و بیشترین حفاظت نانولیپوزوم حاوی رتینول در دمای ۴°C و تحت شرایط تاریکی به‌دست آمد که احتمالاً به دلیل کاهش نفوذپذیری غشا نسبت به اکسیژن، نور و کاهش اکسیداسیون و هیدرولیز فسفولیپید است.

در مورد تأثیر افزودن کلسترول بر پایداری لیپوزوم‌ها نیز لیو و همکاران (۲۰۰۰) به این نتیجه رسیدند که کلسترول از طریق سفت کردن ساختار غشا و افزایش پتانسیل زتا و دفع الکتروستاتیک بین ذرات باعث پایداری لیپوزوم‌ها می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثر غلظت لستین - کلسترول بر تولید و خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات تولید شده به روش تشکیل لایه نازک و با استفاده از امواج فراصوت بررسی شد. نتایج نشان داد، استفاده از امواج فراصوت در تکمیل روش لایه نازک، منجر به تشکیل نانولیپوزوم‌هایی با توزیع یکنواخت و

با تأثیر ماهیت ماده‌ی فعال می‌توان گفت که مواد لیپوفیل بعد از کپسوله شدن در دو لایه‌ی فسفولیپیدی قرار می‌گیرند و زنجیره‌های آسیل فسفولیپید محیط مناسبی برای آن‌ها فراهم می‌کنند و از اکسیداسیون و تجزیه‌ی هیدرولیکی در امان خواهند ماند. سه مزیت اصلی برای درون‌پوشانی ترکیبات چربی‌دوست در نانولیپوزوم‌ها عبارت است از پایداری شیمیایی بالا، سرعت رهایش پایین و کارایی درون‌پوشانی بالا (ایکسا و ایکسو، ۲۰۰۵).

جدول ۲- پایداری فیزیکی محلول ساختار لیپوزومی بهینه (غلظت ۱۰-۵۰ میلی گرم کلسترول - لستین) در طی روزهای اول،

دهم، بیستم و سی نهمه‌داری	
روز نهمه‌داری	درصد پایداری
اول	۱۰۰٪
هفتم	۷۸/۸۲٪
پانزدهم	۷۳/۷۲٪
سی ام	۶۸/۰۹٪

در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است که درون‌پوشانی رتینیل پالمیتات با استفاده از نانولیپوزوم‌های تهیه شده از یک فراکسیون خالص فسفولیپید به همراه ۹۰٪ فسفاتیدیل کولین، از تجزیه‌ی رتینیل پالمیتات در برابر اکسیداسیون ناشی از تابش اشعه خورشید جلوگیری می‌کند (آرسیک و وولتا، ۱۹۹۹). پاداموار و پوخارکار (۲۰۰۶)، نیز کارایی کپسولاسیون ۹۸٪ برای نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین E به دست آوردند که آن‌ها نیز نتایج به‌دست آمده را به لیپوفیل بودن ماده کپسوله شده نسبت دادند. علی‌رغم مطالعات پیشین، احتمالاً در این تحقیق، کاهش ویتامین A پالمیتات درون‌پوشانی شده در طی مدت نگهداری به علت حضور ویتامین در دو لایه فسفولیپید و افزایش سیالیت غشا به دلیل بی‌نظمی بیشتر و نظم‌گیری مجدد زنجیره‌های فسفولیپید بوده و این امر منجر به خروج ترکیب فعال می‌شود. در این راستا بوراب و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش کردند حضور ترکیب درون‌پوشانی شده در دولایه‌ی غشاء فسفولیپید، موجب افزایش سیالیت غشاء و هم‌چنین کاهش دانسیته‌ی این ناحیه از غشاء نسبت به سایر مناطق دو لایه می‌شود.

کالاگنو و همکاران (۲۰۰۷) تفاوت مهم موجود در پروفایل رهاسازی ترکیب فعال محبوس در ساختار نانوحامل را به دو فاکتور مهم نسبت دادند: ۱- قدرت و میزان برهم‌کنش‌ها میان ترکیب فعال و لیپید. ۲- سیالیت و نفوذپذیری دولایه‌ی وزیکول. بدین ترتیب که با افزایش سیالیت دولایه، نشت و خروج ترکیب فعال به محیط آبی در اطراف وزیکول‌ها افزایش می‌یابد. حضور اسیدهای چرب اشباع موجب تثبیت لایه‌های فسفولیپید و دفع آب و کشانده شدن آن به مجاورت سطح دو لایه وزیکول و کاهش سیالیت غشاء می‌شود. از طرف دیگر

مناسب در تولید فرمولاسیون بهینه نانولیپوزوم با کارایی درون پوشانی ۱۵ /۸ درصد شناخته شد و می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که با اینکه استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک به کمک امواج فراصوت، روشی موفق در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات و کاهش ذراتی پایدار در مقیاس نانو در طول زمان بوده است، ولی با توجه به کارایی و پایداری درون‌پوشانی پایین، استفاده از سایر نانوحامل‌ها در درون‌پوشانی ویتامین A پالمیتات پیشنهاد می‌شود.

تک‌مد گردید. ارتباط مستقیم بین غلظت لستین و کارایی درون پوشانی وجود دارد، به طوری که با افزایش غلظت لستین با حفظ حالت نانولیپوزومی تک‌لایه، درصد بارگیری ویتامین A پالمیتات افزایش یافت. همچنین افزودن کلسترول بیشتر بر پایداری اندازه ذرات در طول زمان موثر بود و تغییر معنی‌داری را در اندازه‌ی ذرات هنگام تشکیل لیپوزوم ایجاد نکرد. پایداری الکترواستاتیک نانولیپوزوم‌ها نیز با ورود کلسترول و همچنین ویتامین به ساختار نانولیپوزوم افزایش یافت. غلظت ۵۰ به ۱۰ میلی‌گرم لستین به کلسترول بعنوان غلظت

منابع

- Alexander, M., Lopez, A.A., Fang, Y. and Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *LWT- Food Science and Technology*, 47, 427-436.
- Arsic, I., and Vuleta, G. (1999). Influence of liposomes on the stability of vitamin a incorporated in polyacrylate hydrogel. *International Journal of Cosmetic Science*, 21(4), 219-225.
- Bang, S.H., Hwang, I.C., Yu, Y.M., Kwon, H.R., Kim, D.H., and Park H.J. (2011). Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of Microencapsulation*, 28(7), 595-604.
- Bouarab, L., Maherani, B., Kheirloom, A., Hasan, M., Aliakbarian, B., Linder, M., Arab-Tehrany, E. (2014). Influence of lecithin-lipid composition on physico-chemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 115, 197-204.
- Calvagno, M.G., Celia, C., Paolino, D., Cosco, D., Iannone, M., Castelli, F., Doldo, P., and Fresta, M. 2007. Effects of lipid composition and preparation conditions on physical-chemical properties, technological parameters and in vitro biological activity of gemcitabine-loaded liposomes. *Current Drug Delivery*, 4, 89-101.
- Chanda, H., Das, P., Chakraborty, H. and Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 5, 2230-7885.
- Colas, J.C., Shi, W.L., Rao, V.S.N.M., Omri, A., Mozafari, M.R., and Singh, H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38, 841-847.
- Das, S., Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, 12(1), 62-76
- De Vost, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Fan, M., Xu, Sh., Xia, Sh. And Zhang, X. (2008). Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *European Food Research and Technology*, 227, 167-174.
- Fathi, M., Mozafari, M.R. & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 1-15.
- Fatouros, D.G., and Antimisariis, S.G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 251, 271-277.
- Gibis, M., Zeeb, B., Weiss, J. (2014). Formation, characterization, and stability of hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 38, 28-39.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., and Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146, 276-290.
- Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyobb, M., Kahn, C.J.F., Jabbari, E. Linder, M., Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, 461, 519- 528
- Hamishehkar, H., Emami, J., Rouholamini Najafabadi A., Gilani, K., Minaian M., Mahdavi, H., Nokhodchi, A. (2009). The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloid Surface B*, 74, 340-349.
- Jesorka, A. and Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 801-832.
- Keller, B.C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 25-31.
- Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., and Hofer, F. 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: *An essential tool for*

- characterisation and stability assessment. Micron*, 43, 43(2-3), 85–103.
- Ko, S., and Lee, S.-ch. (2010). Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporated retinol. *African Journal of Biotechnology*, 9, 6158-6161.
- Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R. O., Vuilleumard, J. C., Lacroix, C. and Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability, and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13, 325–336.
- Lee, S. C., Yuk, H. G., Lee, D. H., Lee, K. E., Hwang, Y. I., & Ludescher, R. D. (2002). Stabilization of retinol through incorporation into liposomes. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 358-363.
- Leekumjorn, S., Cho, H.G., Wu, Y., Wright, N.T., Sum, A.K., and Chan, C. (2009). The Role of Fatty Acid Unsaturation in Minimizing Biophysical Changes on the Structure and Local Effects of Bilayer Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1788, 1508–1516.
- Liang, X., Mao, G., and Ng, K.Y.S. (2004). Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278, 53-62.
- Liu, D.Z., Chen, W.Y., Tasi, L.M., and Yang, S.P. (2000). Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*, 172, 57–67.
- Liu, N., Park, H.J. (2010). Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 76(1), 9-16.
- Marsanasco, M., Marquez, A. L., Wagner, J.R., Alonso, S. V. & Chiamoni, N.S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, 1-35.
- Miller, W.L. (2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 663–76.
- Mohammadhasani, Z., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., RezaieMokaram, R. and Yaerhosseini, M. 2013. Gamma Oryzanol Bearing Nanoliposome Produced by Modified Thermal Method: Thermal Property, Encapsulation Efficiency, Oscillatory Rheometry. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*, 26 (5): 413-425.
- MohammadiM., Ghanbarzadeh B., Hamishehkar, H., RezayiMokarram R, Mohammadifar, MA. Physical properties of vitamin D3 loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration – sonication 2013. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(4): 175-188.
- Mozafari, M.R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. and Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2038–2045.
- Mura, P., Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Michelacci, I., Ghelardini, C., and Rabasco, A.M. (2007). Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 86-95.
- Nagle, J. F. and Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469, 159-195.
- Padamwar, M. N., and Pokharkar, V. B. (2006). Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 320, 37-44.
- Rao, R. and McClements, D.J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*. 29: 326-334.
- Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R. and Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry, in press paper*.
- Singh, A.K., and Das, J., (1998). Liposome encapsulated vitamin A compounds exhibit greater stability and diminished toxicity. *Biophysical Chemistry*, 73, 155-162.
- Talor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D. and Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial bearing liposomes by zeta-potential, vesicle size and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2: 1–9.
- Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce, B., and Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587–605.
- Teseng, L.P., Liang, H.J., Chung, T.W., and Liu, T. Z. (2007). Liposome incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 27, 29-34.
- Thompson, A., Haisman, D., and Singh, H. (2006). Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soya phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6390-6397
- Viriyaraj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U. & Opanasopit, P. (2009). Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical development and technology*, 6, 665–671.

- Xia, F., Hu, D., Jin, H., Zhao, Y. and Liang, J. (2010). Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. *Food Hydrocolloids*, 26, 456-463.
- Xia, S., and Xu, S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International*, 38, 289-296.
- Yang, Y., C., Marshal-Breton, M., Leser, A., Sher, and D.J., McClements, (2012). Fabrication of ultrafine edible emulsions: comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloids*. 29, 398- 406.
- Yurdugul, S. & Mozafari, M.R. (2004). Recent advances in micro- and nanoencapsulation of food ingredients. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9, 64-65.

Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation

B. Ghanbarzadeh^{1*}, A. Pezeshky², H. Hamishehkar³, M. Moghadam⁴

Received: 2014.08.17

Accepted: 2015.05.03

Introduction: The encapsulation of hydrophobic nutraceutical compounds such as fat soluble vitamins in nanoliposomes is a potentially effective way to protect them from light, oxygen and chemical degradation during the maintenance. One of the potential benefits of liposomal structures is encapsulation of three water-soluble, fat-soluble and amphiphilic compounds and use of natural food ingredients such as lecithin with beneficial effects, in their production. In this study, the effect of lecithin-cholesterol concentrations on particle size, particle size distribution, encapsulation efficiency (EE) and physical stability of vitamin A palmitate loaded nanoliposome during the storage time were explored to get the optimized formulation

Materials and method:

Materials:

Phospholipid (L- α -granular Lecithin) with purity of 99% was obtained from Across (USA). Cholesterol with 95% purity was supplied by Merck (Germany). Other chemicals were analytical grade and procured from Sigma (Merck Chemical Co. Darmstadt, Germany).

Methods:

Nanoliposomes were prepared from different concentrations of lecithin-cholesterol (60:0, 50:10, 40:20 and 30:30 mg) by thin-film hydration-sonication method. Lecithin and cholesterol were dissolved in absolute ethanol and then dried with vacuum evaporator. Prepared dried lipid film hydrated by aqueous phase. The resultant suspension was mixed for some time (Hydration-dehydration). Due to existence of water inside the lipid film, osmotic pressure runs the water into bilayer membrane and causes separation of lipid film and then liposomes were produced. In this method, mixture of Multilamellar Vesicles (MLVs) and Small Unilamellar Vesicles (SUVs) liposomes were produced. Reduction in particle sizes of prepared liposomes was done by ultra sound probe sonicator. The average diameter and span value of the particles were determined using particle size analyzer (Wing SALD 2101, Shimadzo, Japan), at 25°C and was calculated according to the DeBroukere mean in the Equation (1):

$$\bar{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

The span value is an index helpful to evaluate the particle size distribution and calculated applying the following Equation:

$$Span = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}}$$

Morphology of the nano-carriers was observed using trans- mission electron microscopy (Zeiss-Leo 906 TEM (Germany). To determine the zeta potential of nano liposomes loaded vitamin A, Zeta sizer device (Nano-ZS -Malvern England) was used at 25°C temperature. Estimation of encapsulated vitamin in nanoliposomes (%EE) was carried out using HPLC (Knauer, Germany) equipped with a UV detector, C-18(10 mm 25mm 4.6 mm) column and acetonitrile- methanol (70:30%,v/v) as mobile phase and was calculated using the below equation

- 1- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
 - 2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
 - 3- Associated Professor, Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Technology Laboratory, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences
 - 4- Professor of Crop Production and Plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
- (*Corresponding author: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir)

$$\%EE = \frac{\text{Encapsulated Vitamin A}}{\text{Total Vitamin A}} \times 100$$

The stability of vitamin A loaded-nanoliposomes was assessed by determining the average particle size at 4 °C over storage time and studying the leak out of the vitamin from the nanoliposomes after one month (1, 7, 15 and 30 days) of storage at 4 °C by the below equation

$$\%Stability = \frac{\text{Remained Vitamin A}}{\text{Initial encapsulated Vitamin A}} \times 100$$

Results and Discussion: Results showed use of sonication in completion thin-film hydration method, induced production of monomodal nanoliposomes with uniform distribution. The particle size was in the range of 76-115 nm and particle size distribution was monomodal (span= 0.6- 0.88). In agreement with particle size results, TEM image showed that the vesicles are in the form of small unilamellar vesicles by bilayer nature. In all concentrations of lecithin-cholesterol, obtained EE was low and by increasing the lecithin concentration, loading capacity of nano liposomes increased. By increasing the lecithin concentration, more vesicles are produced which causes increase in internal volume of liposomes and bio actives concentrate, consequently loading capacity of nano liposomes increased. By tightening of the membrane by cholesterol, entrapment efficiency of hydrophobic active compounds such as vitamin A palmitate reduces. Also probably existence of cholesterol in liposome membrane inhibits of rupture and changes in liposome membrane. Overall, increasing the ratio of cholesterol /lecithin had no significant effect on particle size but decreased encapsulation efficiency of vitamin A palmitate to 10.23%. Addition of cholesterol effected on stability of the particle size of nanoliposomes and also led to reduction encapsulation efficiency of vitamin A palmitate. Incorporation of cholesterol and vitamin A palmitate into the liposome structure was increased the zeta potential from -29 to -58 mv and improved electrostatic stability. 50-10 mg ratio of lecithin-cholesterol concentration was used for preparation of optimum formulation of nanoliposome by monomodal and small size distribution (76 nm, span=0.74) and encapsulation efficiency (15.8%). Stability of vitamin A in nano liposome with 50-10 mg lecithin-cholesterol, was almost low (32% reduction during storage time), may be due to increasing fluidity of membrane. Permeability of vitamin A into phospholipid chains causes reorientation of acyl chains which leads to fluidity of membrane and exit active compound from nano carrier and more its hydrolytic degradation and oxidation. While the use of thin film hydration method using ultrasonic waves, is successful way in producing nanoscale particles of vitamin A palmitate nanoliposomes that are stable and decrease over time, but due to low efficiency and low sustainability of encapsulation, use of other nanocarriers for encapsulating of vitamin A palmitate is recommended

Keywords: Nanoliposome, Vitamin A Palmitate, Encapsulation, Physical Stability.

اثر ضد میکروبی فیلم زیست‌فعال زئین حاوی اسانس آویشن علیه *Escherichia coli* و

listeria innocua طی نگهداری سالاد الویه

محبوبه کشیری*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۴

چکیده

بسته‌بندی ضد میکروبی یک فناوری نوین نگهداری است که بر اساس رهائش عوامل فعال ترکیب شده با پلی‌مر بسته‌بندی، به درون محصول غذایی یا محیط اطراف بسته‌بندی برای افزایش کیفیت و امنیت غذایی طراحی شده است. با هدف استفاده از اسانس گیاهان بعنوان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی، فعالیت ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss.*) در محیط مایع (تماس مستقیم) و جامد (فاز بخار) علیه *Escherichia coli* و *listeria innocua* مورد مطالعه قرار گرفت. فیلم‌های زیست‌فعال زئین حاوی ۵ و ۱۰٪ وزنی اسانس آویشن شیرازی تولید و فعالیت ضد باکتریایی فیلم‌ها در محیط مایع و جامد آزمایشگاهی ارزیابی شدند. فعالیت ضد باکتریایی فیلم‌های زئین دارای ۱۰٪ اسانس آویشن شیرازی برای بسته‌بندی سالاد الویه بعنوان یک مدل غذایی طی مدت ۶ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که خواص ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی در تماس مستقیم در مقایسه با فاز بخار از کارایی بهتری برخوردار بود. از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد بین اندیس کاهش لگاریتمی فیلم زیست‌فعال زئین حاوی ۵٪ اسانس آویشن در تماس مستقیم علیه *Escherichia coli* و *listeria innocua* وجود نداشت. همچنین با افزایش غلظت اسانس در فیلم زیست‌فعال زئین اندیس کاهش لگاریتمی باکتریایی در محیط مایع افزایش یافت. علی‌رغم نتایج مطلوب ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی در فیلم‌های زئین در تماس مستقیم، فیلم‌های زیست‌فعال زئین جهت کاهش آلودگی سالاد الویه بسته‌بندی شده از کارایی لازم برخوردار نبودند.

واژه‌های کلیدی: سفتی بسته‌بندی ضد میکروبی، زئین، اسانس آویشن شیرازی، سالاد الویه

مقدمه

استفاده از ترکیبات ضد میکروبی یکی از قدیمی‌ترین روش‌های نگهداری مواد غذایی محسوب می‌گردد. ترکیبات ضد میکروبی در تماس مستقیم ماده غذایی و یا بطور غیرمستقیم با قرار دادن در بسترهای پلی‌مری قادر به کاهش یا به تاخیر انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Guarda et al., 2011). بسته‌بندی ضد میکروبی نوعی بسته‌بندی فعال است که مهاجرت پیوسته ترکیبات ضد میکروبی به سطح ماده غذایی را فراهم می‌سازد، بطوری که تداوم رهائش ترکیبات ضد میکروبی، اجازه رشد به سلول‌های ترمیم یافته میکروبی را نخواهد داد. بنابراین از بسته‌بندی ضد میکروبی به‌عنوان تکنولوژی هردل جهت افزایش امنیت و بهبود کیفیت مواد غذایی یاد می‌شود (Muriel- Galet et al., 2012).

اسانس‌های روغنی از متداول‌ترین ترکیبات قابل استخراج از

برگ، ساقه، غده و گل گیاهان هستند (Tajkarimi et al., 2010). آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora Boiss.* گیاهی معطر از تیره نعناعیان و بومی مناطق گرم ایران، پاکستان و افغانستان می‌باشد (Moradi et al., 2012). مهم‌ترین ترکیبات اسانس آویشن کارواکرول و تیمول می‌باشند (Shojaee-Aliabadi et al., 2014). این ترکیبات به‌عنوان ترکیبی ایمن و سالم مورد تایید سازمان غذا و دارو آمریکا قرار گرفته است (Guarda et al., 2011). اثر ضد میکروبی این اسانس بر *Escherichia coli* و *listeria salmonella typhimurium* (Salarbashi et al., 2014) و *shigella* (Razavilar et al., 2006) و *listeria monocytogenes* (Abdollahi et al., 2004) کپک و مخمر (Suhr et al., 2003) مورد بررسی قرار گرفته است. از یافته‌های علمی در حوزه کاربرد اسانس در تولید فیلم‌های ضد میکروبی نیز می‌توان به تأثیر اسانس آویشن شیرازی در کیتوزان (Moradi et al., 2012)، پلی‌ساکارید محلول سویا (Salarbashi et al., 2014) و کاپاکاراگینان (Shojaee-Aliabadi et al., 2014)

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*) نویسنده مسئول: (Email: kashiri.m@gmail.com)

غذایی (سالاد الویه) در مواجهه با باکتری‌های تهدید کننده سلامت مصرف کنندگان بود.

مواد و روش

مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش آزمایشگاهی شامل زئین شرکت تولیدی مواد شیمیایی نیپون (اوساکا، ژاپن)، گلیسرول (اسکارلب، اسپانیا)، گیاه آویشن شیرازی (مزارع استان فارس)، اتانول (اسکارلب، اسپانیا)، تریپتون سوی برات (اسکارلب، اسپانیا)، تریپتون سوی آگار^۱ (اسکارلب، اسپانیا)، ویولت رد بایل آگار^۲ (اسکارلب، اسپانیا)، لیستریا پالکام آگار^۳ (مرک، آلمان) بودند. سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در پژوهش حاضر شامل *listeria innocua* CECT (ATCC 19114) 934 از دسته باکتری‌های گرم مثبت و *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922) از دسته باکتری‌های گرم منفی که از مرکز کلکسیون میکروبی اسپانیا تهیه شد.

استخراج اسانس

سرشاخه‌های هوایی گیاه آویشن شیرازی استان فارس قبل از گل دهی برداشت و پس از تأیید گروه گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با نام علمی آن *Zataria multiflora* Boiss خشک گردید و به روش تقطیر با بخار آب در مدت ۳ ساعت با استفاده از سیستم کلونجر اسانس‌گیری شد. آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها توسط دستگاه طیف سنج جرمی با ستون موئینه DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، دمای اتافک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز هلیوم ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. طیف سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت (*et al.*, 2013 Elizaquíel).

(*et al.*, 2014) و نیز کاربرد کارواکرول در بستر کیتوزان (Rubilar *et al.*, 2013)، تیمول و کارواکرولدر بستر پلی‌پروپیلن (Guard *et al.*, 2011) اشاره کرد. همچنین اثر افزودن اسانس پونه کوهی در بسترهای پلی‌مری نظیر اتیلن وینیل الکل (Muriel- Galet *et al.*, 2012)، ایزوله سویا (Zinoviadou *et al.*, 2009)، ژلاتین (Hosseini *et al.*, 2013)، تریتیکاله (Aguirrea *et al.*, 2013) گزارش شده است.

در جوامع امروزی با تغییر روش زندگی، فرهنگ استفاده از غذاهای آماده به مصرف نیز رواج فراوانی یافته است. سالاد الویه نوعی غذای سرد شامل گوشت مرغ و سیب‌زمینی و تخم مرغ آب‌پز به همراه سس مایونز، خیارشور و دیگر سبزیجات است که بدون اعمال فرایند حرارتی بسته‌بندی عرضه و در دمای یخچال نگهداری می‌شود. اختلاف درجه حرارت سطح و درون گوشت مرغ طی فرایند پخت گوشت مرغ منجر به حذف بار میکروبی سطحی و زنده ماندن برخی از پاتوژن‌های درونی می‌گردد. همچنین نقص در فرایند حرارتی در آماده‌سازی گوشت مرغ و تخم‌مرغ خطرات ناشی از پاتوژن‌های باکتریایی واقع در تخم مرغ و درون گوشت مرغ را فراهم می‌کند (Luber, 2009). *Escherichia coli* و *Listeria* از جمله باکتری‌های تهدید کننده سلامت مصرف کنندگان می‌باشند.

Listeria در طیف وسیعی از محصولات غذایی آماده به مصرف بسته‌بندی نگهداری شده در شرایط سرد گزارش شده است (Beaufort, 2011 و Newel *et al.*, 2010). با توجه به تنوع ترکیبات در فرمولاسیون محصولات آماده به مصرف، تعیین شرایط مناسب برای رشد هر یک از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با چالشی همراه است. بدین مفهوم که در فرمولاسیون هر یک از این محصولات افزایش یا کاهش یک ماده می‌تواند تشدید یا محدودیت رشد میکروارگانیسم‌های شاخص را سبب گردد. لذا در این خصوص یکی از راه‌های ارزیابی پتانسیل رشد میکروارگانیسم‌ها در محصولات فرموله شده، تلقیح تعداد مشخصی از آن‌ها و ارزیابی توانایی رشد در محصول است (Beaufort, 2011). روش‌های مختلفی جهت به حداقل رساندن مصرف مواد افزودنی شیمیایی برای مهار رشد میکروبی در مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفته است که در این بین استفاده از فیلم‌های ضد میکروبی همراه با سایر هردل‌ها ضمن حفظ کیفیت و طراوت محصول بعنوان یک مهار کننده نهایی رشد میکروارگانیسم‌ها معرفی شده است (Muriel- Galet *et al.*, 2012).

فیلم‌های ضد میکروبی علاوه بر نوآوری در بخش علمی، در مقیاس صنعتی مورد استقبال مصرف کنندگان و تولید کنندگان جهت به تضمین سلامت مصرف کنندگان قرار گرفته است. لذا هدف از این پژوهش تولید فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی و ارزیابی اثر عملکرد فیلم تولیدی در محیط آزمایشگاهی و یک مدل

1 Tryptone Soy Agar (TSA)

2 Violet Red Bile Agar

3 Listeria Palcam Agar

آماده‌سازی فیلم

بر اساس آزمایشات اولیه محلول ۱۶ درصد وزنی- وزنی زئین در اتانول ۸۰ درصد تهیه و به مدت یک ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه حرارت داده شد. در ادامه گلیسرول به‌عنوان نرم‌کننده (۱۵/۰ درصد وزن زئین) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاملاً همگن شد. محلول حاصل روی صفحه شیشه‌ای پوشیده از ورقه نازک پلی‌پروپیلن پخش و در تونل مجهز به منبع حرارتی به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد. فیلم زئین فعال نیز مطابق روش فوق آماده شد، با این تفاوت که پس از افزودن گلیسرول به مدت ۸ دقیقه عمل هم زدن صورت گرفت و در ادامه اسانس آویشن در سطح ۵ و ۱۰ درصد نسبت به وزن زئین اضافه و به مدت ۷ دقیقه هم زدن انجام شد.

ارزیابی خواص ضد باکتریایی اسانس به‌روشن میکرو پلیت

به‌منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد اسانس آویشن از روش رقیق‌سازی در چاهک‌های در میکرو پلیت استفاده شد (NCCLS, 2000).

ارزیابی خواص ضد باکتریایی بخار اسانس آویشن شیرازی و

فیلم زیست فعال زئین

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی *Escherichia coli* و *listeria innocua* با استفاده از سوآپ استریل، روی محیط کشت تریپتون سوی آگار پخش گردید. دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ۴ سانتی‌متر در سطح فوقانی پلیت‌ها چسبانده و اسانس آویشن در مقادیر ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. در ادامه جهت کاهش خروج ترکیبات فرار موجود در اسانس، هر یک از پلیت‌ها با پارافیلیم محصور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند (Muriel- Galet et al., 2012).

فیلم‌های زیست فعال بر پایه زئین به قطر ۴ و ۸ سانتی‌متر مشابه روش اشاره شده در فوق آماده و به درب پلیت‌ها برای ارزیابی خاصیت بازدارندگی بخار اسانس آویشن، بدون تماس مستقیم با میکروارگانیسم، چسبانده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. نتایج فعالیت ضد میکروبی در فاز بخار نیز بر اساس شدت تأثیرگذاری ترکیب ضد میکروبی با اصطلاحاتی نظیر بازدارندگی کامل (+++) در شرایطی که رشد باکتری‌ها بطور کامل متوقف گردد، بازدارندگی نسبی (++) در مواردی که اندکی رشد میکروبی مشاهده گردد، کاهش قابل مشاهده در دانسیته میکروبی (+) زمانی که در مقایسه با نمونه شاهد رشد باکتری‌های اندکی تقلیل یابد و در نهایت فاقد بازدارندگی (-) بدین مفهوم که باکتری‌ها بطور کامل رشد نمایند (Gomez- Esteca et al., 2010).

ارزیابی خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین در محیط

مایع آزمایشگاهی

۰/۲۵ گرم از فیلم زیست‌فعال زئین حاوی اسانس آویشن در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول تریپتون سوی برات قرار داده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی (جمعیت میکروبی تقریبی ۱۰^۸ CFU/ml) اضافه و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد میکروب‌ها شمارش شدند (Muriel- Galet et al., 2012).

ارزیابی خواص ضد باکتریایی فیلم زیست فعال زئین در مدل غذایی

به‌منظور ارزیابی کارایی فیلم زیست فعال زئین حاوی ۱۰ درصد اسانس در مدل غذایی (سالاد الویه) نمونه‌های به شرح زیر آماده شدند.

سالاد الویه بسته‌بندی شده در فیلم زئین فاقد اسانس (نمونه شاهد)

سالاد الویه بسته‌بندی شده فیلم زئین حاوی اسانس آویشن (نمونه فاقد تلقیح باکتریایی)

سالاد الویه بسته‌بندی شده در فیلم زئین حاوی اسانس آویشن (نمونه حاوی تلقیح باکتریایی)

پس از آماده‌سازی بسته‌ها در دمایی خچال به مدت ۶ روز نگهداری و آزمون‌های میکروبی مطابق روش Muriel Galat و همکاران (۲۰۱۲) در روز اول، سوم و ششم انجام شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد و تجزیه و تحلیل نتایج آن با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه دانکن در سطح آماری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

بر اساس طیف‌سنجی جرمی انجام شده ۱۴ ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی از شناسایی و در جدول ۱ خلاصه شد. کارواکرول (۳۷/۲۲ درصد) بیش‌ترین ترکیبات اصلی شناسایی شده اسانس بود. پس از آنتیمول (۲۸/۴۱ درصد)، گاماترپین (۷/۱۴ درصد) و آلفاپینن (۴/۲۶ درصد) بودند. مشتقات فنیل پروپانویدها بیش‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. خواص ضد میکروبی آویشن و پونه‌کوهی به‌حضور ترکیبات فنولی به‌ویژه تیمول و کارواکرول بستگی دارد.

می شود که در نهایت منجر به بی ثباتی غشاء سلولی باکتری می گردد (Elizaquível et al., 2013).

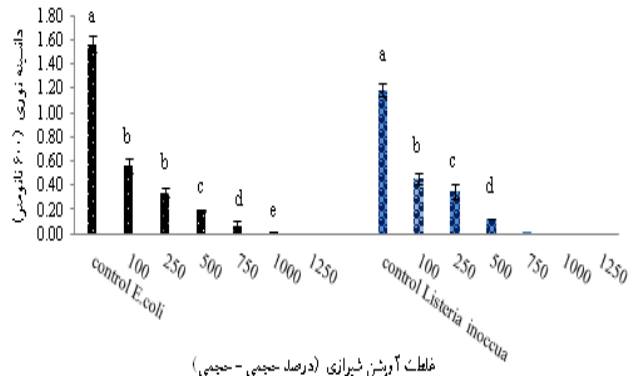
خواص ضد باکتریایی بخار اسانس آویشن در محیط آزمایشگاهی

تبخیر ترکیبات ضد میکروبی و مهاجرت آن به فضای خالی بسته بندی یک مزیت ویژه برای کاهش بار میکروبی مواد غذایی در مقایسه با ترکیبات ضد میکروبی غیر فرار محسوب می گردد (Han., 2000). نتایج حاصل از تأثیر بخار اسانس آویشن شیرازی در محیط جامد در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طوری که جدول ۱ مشاهده می شود، بازدارندگی ناشی از تبخیر اسانس آویشن شیرازی بر *listeria innocua* در غلظت ۵۰ و ۷۵ میکرولیتر بیش از *Escherichia coli* بود. در تفسیر علت این پدیده می توان بوجه دیواره لیپوپولی ساکارید در باکتری های گرم منفی اشاره کرد که از ورود ترکیبات فعال به غشاء سیتوپلاسمی ممانعت به عمل می آورد (Bozin et al., 2007). همچنین وجود آنزیم ها در فضای پری پلاسمیک باکتری های گرم منفی سبب شکستن ترکیبات ضد میکروبی و جلوگیری از ورود آن به درون سلول می گردد. این در حالی است که باکتری های گرم مثبت فاقد فضای پری پلاسمیک هستند و ترکیبات ضد میکروبی به آسانی دیواره سلول و غشاء سیتوپلاسمی را تخریب و منجر به خروج سیتوپلاسم از سلول می گردد. ترکیبات ضد میکروبی بسته به ماهیت آن ها، مکان هایی خاصی از میکروارگانیسم را مورد هدف قرار می دهند (Burt., 2004). اسانس ها با اتصال به بخش های لیپیدی باکتری ها، نفوذ پذیری غشاء سیتوپلاسمی را افزایش می دهند که این پدیده منجر به خروج یون ها و اجزاء سلولی می گردد (Estaca et al., 2010). نتایج پژوهش حاضر حاکی از کاهش قابل مشاهده در دانسیته (+) دو باکتری فوق با استفاده از ۲۵ میکرولیتر اسانس آویشن شیرازی بود. محدوده بازدارندگی در برابر باکتری *listeria innocua* با افزایش مقدار اسانس مصرفی به ۵۰ میکرولیتر افزایش (++) یافت. در حالی که در باکتری *Escherichia coli* تنها کاهش دانسیته میکروبی (+) مشاهده گردید. حداقل غلظت لازم اسانس برای بروز اثرات ضد میکروبی مطلوب در برابر *Escherichia coli* بیش از ۵۰ میکرولیتر بود. محدوده بازدارندگی بخار حاصل از ۷۵ میکرولیتر اسانس در برابر *listeria innocua* (+++) بیش از *Escherichia coli* بود. بیشترین محدوده بازدارندگی باکتریایی ناشی از بخار اسانس، بازدارندگی کامل (+++)، در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بازدارندگی بخار اسانس علیه *Escherichia coli* در محیط جامد با افزایش غلظت اسانس از ۵۰ به ۱۰۰ میکرولیتر افزایش یافت که از این حیث با گزارش Tajkarimi و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت.

جدول ۱- ترکیبات قابل شناسایی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از طیف سنج جرمی

ترکیب	مقدار (%)	شاخص بازداری
توژن	۰/۲۹	۹۳۰
آلفا پینن	۴/۲۶	۹۳۷
بتا پینن	۰/۱۶	۹۷۶
بتا میرسین	۰/۸۵	۹۸۵
پی سیمن	۳/۲۷	۱۰۲۴
گاما ترپینن	۷/۱۴	۱۰۵۵
آلفا ترپینن	۲/۲۳	۱۰۶۱
لینالول	۱/۶۳	۱۰۹۰
آلفا ترپینول	۰/۷۷	۱۲۰۹
تیمول متیل استر	۱/۴۷	۱۲۳۶
کارواکرول متیل استر	۳/۴۹	۱۲۴۳
کارواکرول	۳۷/۲۲	۱۳۱۴
تیمول	۲۸/۴۱	۱۴۱۸
گلوبوبول	۲/۳۲	۱۵۸۲
مجموع	۹۳/۹۵	-

بر اساس داده های دانسیته نوری، حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی در برابر *Escherichia coli* و *listeria innocua* به ترتیب ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید (شکل ۱).



شکل ۱- متوسط جذب نور ناشی از *Escherichia coli* و *listeria innocua* در غلظت های مختلف اسانس آویشن (درصد حجمی - حجمی)

با مقایسه نتایج حاصل با گزارش Elizaquível و همکاران (۲۰۱۳) می توان بیان داشت که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی در مقایسه دارچین، میخک و پونه کوهی علیه *monocytogenes listeria* و *Escherichia coli* پایین تر بود. اثر ضد میکروبی اسانس آویشن به ساختار کارواکرول و تیمول، توانمندی این ترکیبات در برقراری پیوندهای هیدروژنی، ترکیب آن ها با سایر مونوترپن ها نظیر گاماترپینن ها و بروز اثرات سینرژیستی نسبت داده

جدول ۲- تأثیر مقدار اسانس آویشن بر مهار رشد باکتریایی در فاز بخار

بخار		مقدار اسانس آویشن (میکرولیتر)
<i>Escherichia coli</i>	<i>listeria innocua</i>	
+	+	۲۵
+	++	۵۰
++	+++	۷۵
+++	+++	۱۰۰

در ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها در تماس مستقیم با محیط جامد، ضریب نفوذپذیری و قدرت انحلال آن‌ها تعیین‌کننده شدت اثر می‌باشد، درحالی‌که در تماس غیرمستقیم اسانس با محیط جامد، میزان فراریت ترکیبات اسانس نقش مهم ایفا می‌کنند. اثرات ضد باکتریایی فاز بخارهای اسانس مرکبات در محیط جامد، *et al.*, (Tyagi)(2010)، پونه کوهی (Muriel- Galet *et al.*، 2012)، آویشن و مرزنجوش (Lopez *et al.*، 2007) و (Suher *et al.*، 2003) مورد ارزیابی قرار گرفته است. حداقل غلظت بخارات اسانس پونه کوهی (۵۰ میلی‌گرم) برای بروز بازدارندگی کامل باکتریایی (+++) در مقایسه با اسانس مرکبات (۷ میلی‌گرم) بیش‌تر گزارش شده است (Muriel- Galet *et al.*، 2012). لذا بر این اساس می‌توان بیان داشت که حداقل غلظت مورد نیاز اسانس آویشن شیرازی برای بروز اثرات بازدارندگی در تماس غیرمستقیم (فاز بخار) نسبت به اسانس مرکبات و پونه کوهی بالاتر بود.

خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین

خواص ضدباکتریایی بخار اسانس فیلم زیست فعال زئین

نتایج تأثیر غلظت ۵ و ۱۰ درصد اسانس آویشن شیرازی در فاز بخار در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طوری که مشاهده می‌شود، فاز بخار اسانس فیلم زیست فعال زئین حاوی ۵ درصد اسانس آویشن شیرازی در قطر ۴ سانتی‌متری، فاقد اثرات بازدارندگی در مقابل *Escherichia coli* و *listeria innocua* بود. با افزایش غلظت اسانس (۱۰ درصد) و سطح مقطع (۸ سانتی‌متر) فیلم زیست فعال زئین، در مقایسه با نمونه شاهد کاهش دانسیته میکروبی در برابر *Escherichia coli* و *listeria innocua* مشاهده شد. لازم به ذکر است که فیلم زئین بدون اسانس، فاقد هرگونه فعالیت ضد باکتریایی بود.

یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج Muriel-Galet و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر افزایش شدت ضد میکروبی فاز بخار اسانس پونه کوهی در بستر اتیلن وینیل الکل در مقایسه با دیسک‌های کاغذی حاوی اسانس مطابقت نداشت. در خصوص تفسیر نتایج فوق، ضمن

در نظر گرفتن شدت فراریت ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آویشن و با استناد به استدلال‌های Murirel- Galet و همکاران (۲۰۱۲) مبتنی بر تأثیر بستر الحاق اسانس در قدرت فراریت و انتشار می‌توان بیان داشت که به سبب ماهیت آب‌گریزی پلی‌مر زئین، ترکیبات مؤثر اسانس آویشن در ساختار فیلم محبوس و قدرت رهایش در محیط اطراف کاهش و در نتیجه اثرات ضد میکروبی در فاز تبخیر نیز کاهش یافت. علی‌رغم عدم مطابقت نتایج این تحقیق با Murirel- Galet و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر افزایش اثرات ضد میکروبی فاز بخار اسانس در ترکیب با فیلم زیست فعال، اما در اصل مبحث که همانا نقش بستر در بروز عوامل ضد میکروبی اتفاق نظر وجود داشت. بدین مفهوم که محققان فوق اختلاف ماهیت دیسک‌های کاغذی و اتیلن وینیل الکل بر مهار نسبی تبخیر اسانس اثرگذار معرفی کردند. در حالی‌که در تحقیق حاضر احتمالاً آب‌گریزی بیش‌تر زئین در مقایسه با دیسک‌های کاغذی (سلولزی)، سبب مهار تأثیر ضد میکروبی در فاز بخار اسانس گردیده است.

جدول ۳- تأثیر غلظت اسانس در ترکیب فیلم زئین بر مهار رشد

باکتریایی در فاز بخار

قطر فیلم	نوع باکتری	محدوده بازدارندگی	
		فیلم فاقد اسانس	فیلم حاوی ۵٪ اسانس
۴ سانتی‌متر	<i>listeria innocua</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
۸ سانتی‌متر	<i>listeria innocua</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-

(-) فاقد اثر بازدارندگی، (+) کاهش قابل مشاهده در دانسیته میکروبی.

خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین در محیط مایع

اثر ضد باکتریایی فیلم‌های زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی در محیط تلقیح شده *listeria innocua* و *Escherichia coli* پس از ۶ روز نگهداری در محیط مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند. نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن بود که تعداد کلنی‌های قابل شمارش *listeria innocua* و *coli* در محیط مایع حاوی فیلم زیست فعال زئین با ۵ درصد اسانس آویشن شیرازی به ترتیب دارای $7/06 \text{ Log CFU/ml}$ و $7/73$ بود که با شمارش تعداد باکتری‌های تلقیح شده در نمونه شاهد، اندیس کاهش لگاریتمی *Escherichia coli* و *listeria innocua* به ترتیب $1/14$ و $1/39$ محاسبه گردید. با افزایش غلظت اسانس در فیلم زئین فعال، اندیس کاهش لگاریتمی در برابر *listeria innocua* و *Escherichia coli* به ترتیب به $2/75$ و $3/07$ افزایش یافت. همان‌طوری که در جدول ۴ مشاهده می‌شود از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین

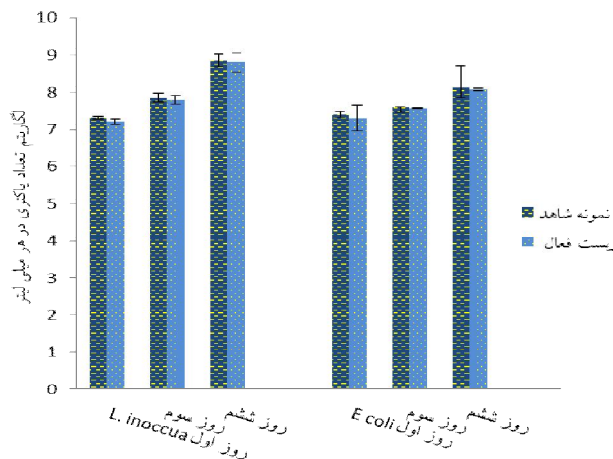
اندیس کاهش *Escherichia coli* و *listeria innocua* در سطح احتمال ۵ درصد وجود نداشت. جدول ۴- اثر ضد باکتریایی فیلم زیست فعال زئین در برابر *listeria innocua* و *Escherichia coli* در محیط مایع

<i>Escherichia coli</i>		<i>listeria innocua</i>		
LRV	Log CFU/ml	LRV	Log CFU/ml	
	۷/۷۳±۰/۳۶		۷/۰۶±۰/۳۴	شاهد میکروبی* (A)
۱/۳۹ ^a	۶/۳۴±۰/۱۲	۱/۴ ^{a***}	۵/۹۲±۰/۲۱	۵٪ اسانس آویشن
	۶/۲۰±۰/۷۷		۷/۳۵±۰/۱۵	شاهد میکروبی* (B)
۳/۰۷ ^b	۳/۱۲±۰/۴۹	۲/۷۵ ^b	۴/۶۰±۰/۳۲	۱۰٪ اسانس آویشن

**حروف غیرمشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است (P<۰/۰۵)

*شاهد میکروبی A و B به ترتیب نمونه شاهد بار میکروبی فیلم حاوی ۵ و ۱۰ درصد فیلم حاوی اسانس

الویه حاوی پروتئین (سیب زمینی و گوشت مرغ) و چربی (سس مایونز) می باشد، ترکیبات فعال اسانس می توانند به سبب برهم کنش هایی با مواد تشکیل دهنده سالاد الویه خنثی گردند. از طرفی دیگر کاهش مقدار آب در مدل غذایی در مقایسه با محیط کشت مایع آزمایشگاهی می تواند دسترسی ترکیب ضد میکروبی را به باکتری کاهش دهد (Smith-Palme et al., 2001). همچنین حضور منبع غنی و قابل دسترس ترکیبات مغذی در مدل غذایی می تواند در ترمیم سلول های آسیب دیده باکتری کمک نماید (Gill et al., 2002). ضمن آن که بر اساس گزارش Marcos و همکاران (۲۰۱۳) نوع فیلم بسته بندی، ماهیت غذا، نوع و غلظت ترکیب ضد میکروبی در کارایی بسته بندی فعال نیز مؤثر می باشد. همچنین کاهش خواص ضد میکروبی فیلم زئین فعال به عنوان یک پلی مر پروتئینی آب گریز را می توان به محبوس شدن احتمالی ترکیبات فعال اسانس در بستر پلی مری و کاهش رهایش آن ها نیز نسبت داد.



شکل ۲- ارزیابی خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین (۱۰٪ اسانس آویشن) در مدل غذایی (سالاد الویه)

خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین در مدل غذایی

در راستای ارزیابی اثر بخشی فیلم زئین فعال در بسته بندی سالاد الویه، در گام نخست آزمون های میکروبی عدم حضور *Escherichia coli* و *listeria innocua* در محصول اولیه تایید شد. همان طوری که در شکل ۲ مشاهده می شود، تعداد *listeria innocua* قابل شمارش نمونه شاهد آلوده در روز نخست پس از تلقیح برابر $7/33 \pm 0/2$ CFU/ml بود. مقایسه اندیس لگاریتم کاهش فیلم زیست فعال حاوی ۱۰ درصد اسانس آویشن ($0/8$ CFU/ml) با نمونه شاهد حاکی از عدم کاهش معنی دار بود. نتایج بررسی سالاد الویه تلقیح شده به *listeria innocua* و بسته بندی شده با فیلم فعال زئین در روز سوم حاکی از افزایش $0/56$ لگاریتمی جمعیت میکروبی ($7/79 \pm 0/11$ CFU/ml) نسبت به روز اول بود. مقایسه اندیس کاهش لگاریتمی با نمونه شاهد ($7/86 \pm 0/10$ CFU/ml) نشان داد که جمعیت میکروبی $0/06$ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. جمعیت و *listeria innocua* در روز ششم نگهداری سالاد الویه بسته بندی شده در فیلم فعال زئین و فیلم شاهد به ترتیب $8/240 \pm 0/17$ و $8/81 \pm 0/24$ CFU/ml و شمارش شد. همان طوری که در شکل ۲ نشان داده شده است جمعیت *Escherichia coli* در طی شرایط نگهداری کاهش معنی دار در سطح آماری ۵ درصد مشاهده نشد. بنابراین بر اساس نتایج تحقیق حاضر می توان اظهار داشت که فیلم فعال زئین علی رغم اثر بخشی در محیط آزمایشگاهی از کارایی لازم به منظور کنترل جمعیت باکتریایی در مدل واقعی غذایی برخوردار نبود. در تفسیر علت کاهش کارایی خواص ضد میکروبی در یک سیستم واقعی غذایی می توان بیان داشت که عوامل متعددی علاوه بر نوع میکروارگانیسم هدف در بروز این پدیده دخالت دارند که در این میان ویژگی های محصول غذایی نظیر pH، فعالیت آبی، مقدار چربی و پروتئین، آنتی اکسیدان، نمک و همچنین عوامل خارجی (دمای نگهداری و ترکیبات اتمسفر) نقش به سزایی دارند (Burt., 2004) و (Quintavalla et al., 2002). با توجه به این که سالاد

نتیجه گیری

نقش ماهیت پلی‌مر در بروز فعالیت ضد باکتریایی از طریق بخارات اسانس آویشن شیرازی مورد تایید قرار گرفت. فعالیت ضدباکتریایی بخارات اسانس آویشن در ترکیب با زیست پلی‌مر زئین کاهش یافت. علی‌رغم نتایج ضدمیکروبی ضعیف فاز بخار فیلم فعال در محیط جامد، این ترکیب به‌عنوان یک افزودنی طبیعی در ترکیب با پلی‌مر زئین در تماس مستقیم در محیط مایع از کفایت لازم برخوردار بود. نظر به اهمیت کنترل جمعیت میکروبی و تضمین امنیت مواد غذایی با تکیه بر رهائش ترکیبات فعال در مدل‌های واقعی غذایی می‌توان اظهار کرد که فیلم زئین حاوی اسانس به‌عنوان تکنولوژی هردل در کنترل رشد لگاریتمی *Escherichia coli* و *listeria innocua* تلقیح شده در سالاد الویه مثبت ارزیابی نگردید و نقش نوع

منابع

- Abdollahi, M., Rezaei, M & Farzi, G., 2012, A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343-350.
- Aguirrea, A., Borneoa, R. B & Leon, A. E., 2013, Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2-9.
- Alboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H & Abdollahi, M., 2014, Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogen. *Food Control*, 36, 1-7.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M & Debevere, J., 2004, Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *Shigella flexner*. *Food Microbiology*, 21(1), 33-42.
- Beaufort, A., 2011, The determination of ready-to-eat foods into *Listeria monocytogenes* growth and no growth categories by challenge tests. *Food Control*, 22(9), 1498-1502.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I & Jovin, E., 2007, Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(19), 7879-7885.
- Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Elizaquível, P., Azizkhani, M., Sánchez, G & Aznar, R., 2013, Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil activity against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables. *Food Control*, 34(2), 770-776.
- Gill, A., Delaquis, P., Russo, P & Holley, R., 2002, Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1), 83-92.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C & Montero, P., 2010, Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J & Galotto, M. J., 2011, The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 144-150.
- Guynot, M., Ramos, A., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V & Marin, S., 2003, Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 893-899.
- Han, J. H., 2000, Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, 54, 56-65 .
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M & Ghavi, F. F., 2013, Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1490-1495.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R & Nerin, C., 2007, Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms. *Journal of Agriculture and Food*

فیلم، خواص و ماهیت ترکیبات ضد میکروبی و هم‌چنین ماهیت ماده غذایی مورد هدف در چگونگی عملکرد فیلم‌های فعال ضدمیکروبی قابل توجه معرفی گردید.

قدردانی

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و گروه بسته‌بندی IATA والنسیا به‌ویژه دکتر رافائل گابارا، گرسیا لویز-کارابایو و ویرجینیا موریل‌گلت که با فراهم آوردن امکانات تحقیق و حمایت‌های علمی مرا یاری کردند، سپاسگزاری می‌گردد.

- Chemistry*, 55(11), 4348-4356.
- Luber, P., 2009, Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs—which risks need to be managed first?. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1-2), 21-28.
- Marcos, B., Aymerich, T., Garriga M. & Arnau, J., 2013, Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control*, 30(1), 325-330.
- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S. M., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J & Hadian, M., 2012, Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT- Food Science and Technology*, 46(2), 477-484.
- Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., López-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R & Hernández-Muñoz, P., 2012, Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 195-201.
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H & Kruse, H., 2010, Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S3-S15.
- Quintavalla, S & Vicini, L., 2002, Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62(3), 373-380.
- Razavilar, V., Akhoundzadeh Basti, A., Abbasifar, R & Radmehr, B., 2006, Effect of zataria multiflora Boiss. essential oil, acetic acid, temperature and storage time on probabl growth of salmonella typhimurium in Brain heart infusion broth. *Journal of veterinary research*, 61(2), 135-141.
- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A. A., Khmelinskii, I & Vieira, M. C., 2013. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 466-474.
- Salarbashi, D., Tajik, S., Aliabadi, S. S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R & Shahidi Noghabi, M., 2014, Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated Zataria multiflora Boiss. and Mentha pulegium essential oils. *Food Chemistry*, 146, 614-622.
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S. M & Khaksar, R., 2014, Characterization of κ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 101(0), 582-591.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J & Fyfe, L., 2001, The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18(4), 463-470.
- Suhr, K. I & Nielsen, P. V., 2003, Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 665-674.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A & Cliver, D. O., 2010, Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
- Tyagi, A. K & Malik, A., 2010, Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against Pseudomonas fluorescens. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 205-210.
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P & Biliaderis, C. G., 2009, Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82(3), 338-345.

Performance of antimicrobial bio active zein film against *Escherichia coli* and *Listeria innocua* during storage of Olivier salad

M. Kashiri¹

Received: 2014.09.05

Accepted: 2015.01.04

Introduction: Antimicrobial packaging is a novel preservation technology that is designed base on releasing of active agents incorporated with the packaging polymer into the packaged food or the surrounding environment for improving the quality and food safety. Zein, water insoluble protein of corn of corn, reported to be thermoplastic material with high tensile strength, excellent hydrophobic film, biodegradability. *Zataria multiflora* Boiss. (Z) is a thyme-like plant belonging to the Lamiaceae family that geographically grows wild in central and southern parts of Iran. Antimicrobial activity of Z essential oil (ZEO) has been successfully tested against foodborne pathogens. Most of the studies on antimicrobial packaging mainly focused on the initial screening of newly developed films for ZEO in laboratory media and quantifying the bacterial reductions obtained during storage for different types of packaged food products. It is really important to know the variation in antibacterial activity of the agents when incorporated into the packaging film from its original activity in order to establish the levels that need to be incorporated for effective bacteria inhibition, hence the aims of the present study were to investigate the antimicrobial potential of ZEO incorporated zein film against pathogenic microorganisms inoculated in olivier salad to provide evidence of their applicability in the design of active food packaging systems.

Materials and method: Z was collected in the Shiraz province of Iran and extracted by using cleverger type apparatus. Chemical composition ZEO was analyzed by gas chromatography. Antibacterial activity of ZEO was studied in the liquid (direct contact) and solid media (vapour phase) against *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. Zein powder was dissolved in a hydro alcoholic solution to obtain 16% (w/w) films forming solutions. The solution was stirred for at 80 °C using a magnetic stirrer hotplate. Glycerol (15%) was added to the solution and stirred again for 8 min at 30°C, then ZEO was added to the polymer solutions in 5% and 10% with respect to polymer content and stirred for 8 min. Films were obtained by casting, the film forming solutions were extended over it using an extension bar and introduced in a drying tunnel equipped with a heat of 2500 W during 20 min. Control zein films were prepared without active agent. To evaluate the efficacy of developed zein films was tested against two bacteria. Prior to the experiment, a loop of each strain was transferred to 10 ml of TSB and incubated at 37 °C for 18 h to obtain early stationary phase cells and 100 µl of microorganism were inoculated into tubes with 10 ml of TSB. The tubes were then incubated at 37 °C for 18 h and 4 °C for 5 days. As control, zein film without active agent was also used in every experiment. Antibacterial activity of zein films containing 10% ZEO were evaluated for packaging of olivier salad as a real food model for 6 days, by performing serial dilutions with peptone and subsequent plating in Palcam *Listeria* Selective Agar and Brilliant Green Agar for *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. Plates were incubated at 37 °C for 48 hours.

Results and Discussion: GC-MS analysis showed that the major compound of ZEO was carvacrol (45.22%). The antimicrobial effects of ZEO in the vapor phase against *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by using the disk diffusion method showed that the 25 µg of ZEO produced a visible decrease in microbial density retraction zone (+). No inhibition was observed with the addition of lower amounts of the antimicrobial agents, therefore 25 µg was the minimum inhibitory concentration (MIC). Active zein films containing 5% ZEO weren't able to inhibit the growth of the two bacteria in the vapour phase. When the concentrations of ZEO was increased to 10%, only active films with a diameter of 80 mm (50.24 cm²) provided a retraction zone (+) against *Listeria innocua* and *E. coli*. These values were indicative that incorporation of the agent in the zein films produced weaker vapor phase inhibition than its incorporation in the paper disk. The results of this study showed that films with 5% ZEO caused a growth reduction of 1.17 log against *Listeria innocua* and 1.14 log against *Escherichia coli*, while 10% ZEO produced reductions of 2.16 and 2.64 log against *Listeria innocua*, *Escherichia coli* respectively. There was no significant difference between log reduction values of ZEO incorporated in zein films against *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. And also in the liquid media with

1- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

(*Corresponding author: kashiri.m@gmail.com)

increasing the concentration of ZEO in zein films, the log reduction values were increased against both bacteria. Despite of the excellent antibacterial effect of ZEO in zein films in direct contact, bio active zein films were not effective enough for reducing the contamination of packaged Olivier.

Keywords: Antibacterial packaging; Zein; Essential oil

بررسی تاثیر اسانس‌های ریحان و مریم گلی کبیر بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز و اسپرژیلوس

فلاووس در پنیر سفید ایرانی

مریم عزیزخانی^{۱*}، فهیمه توریان^۲، مریم بریری^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۰۴

چکیده

با توجه به تاثیرات منفی نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت مصرف‌کنندگان، توجه مراجع قانونی و صنایع غذایی بر کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بعنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی متمرکز شده است. در این پژوهش تاثیر اسانس‌های ریحان و مریم گلی کبیر بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز و اسپرژیلوس فلاووس طی دوره نگهداری پنیر سفید ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت. روش‌های بکار رفته در این تحقیق مشتمل بر تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)، حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس‌ها، تعیین تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر رشد لیستریا و اسپرژیلوس در پنیر طی دوره نگهداری محصول بود. ترکیبات اصلی اسانس مریم گلی کبیر شامل لینالیل استات، لینالول و اسانس ریحان شامل لینالول و آلفا-کادینول بود. MIC و MBC اسانس مریم گلی، به ترتیب، معادل ۰/۰۱۵٪ و ۰/۰۲٪ و اسانس ریحان برابر با ۰/۰۵٪ و ۰/۰۶٪ برای لیستریا بود. همچنین، MIC و MFC در برابر اسپرژیلوس برای اسانس مریم گلی معادل ۰/۰۵٪ و ۰/۰۶۵٪ و برای اسانس ریحان برابر با ۰/۰۶٪ و ۰/۰۸٪ بدست آمد. غلظت ۰/۳۵٪ اسانس مریم گلی و ۰/۰۵٪ اسانس ریحان از تولید اسپور توسط قارچ در محیط کشت جلوگیری نمود. اسانس مریم گلی در غلظت ۱٪ طی دوره نگهداری پنیر از رشد اسپرژیلوس بطور کامل بازداری نمود و جمعیت لیستریا را نسبت به شاهد $\log 6$ کاهش داد. اسانس ریحان تاثیر ضدمیکربی ضعیف‌تری نسبت به اسانس مریم گلی کبیر نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اسپرژیلوس فلاووس، پنیر، ریحان، لیستریا مونوسیتوژنز، مریم گلی کبیر

مقدمه

غذایی مورد استفاده قرار گرفته اند (Bart, 2004). مطالعات مختلفی ویژگی‌های ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد انگلی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی را تایید نموده و برخی از این ترکیبات نیز در نگهداری مواد غذایی بکار می‌روند (Basti et al., 2007). اسانس‌ها با استفاده از ویژگی آبرگری خود و قابلیت نفوذ به لپید غشایی وارد سلول میکروارگانیسم شده و موجب خارج شدن یون‌ها و محتویات سلولی می‌شوند. خروج این مواد از سلول، موجب ایجاد اختلال در عملکرد سلولی و در نتیجه مرگ آن می‌شود (Bart., 2004). مریم گلی کبیر (*Salvia sclarea*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) گیاهانی علفی از تیره نعناعیان بوده که در سراسر جهان رویشی وسیع دارند. گونه‌های مختلف جنس مریم گلی دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد توموری، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بوده و در درمان برونشیت، ناراحتی‌های گوارشی و سل مفید هستند. در سال‌های اخیر گزارش شده است که اسانس مریم گلی به دلیل وجود ترکیب (۸- سینئول دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌باشد (کاشمی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸). ریحان در طب سنتی بعنوان خلط‌آور، ضد نفخ، جهت تسکین درد معده و محرک استفاده می‌شود.

از آنجا که سلامت غذا مساله‌ای بنیادی، از دیدگاه مصرف‌کنندگان مواد غذایی، مراجع قانونی و نیز صاحبان صنایع غذایی می‌باشد و با عنایت به گزارش‌های مرتبط با موارد متعدد عفونت‌ها و مسمومیت‌های حاصل از مواد غذایی آلوده، توجه به ایمنی غذا و نیز ارائه راهکارهایی جهت نگهداری طولانی‌تر مواد غذایی در حال گسترش است. با توجه به تاثیرات منفی نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت، تحقیقات اخیر بر کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بعنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی متمرکز شده است.

اسانس‌های گیاهی مایعات روغنی معطری هستند که از بخش‌های مختلف گیاه بدست آمده و از گذشته بعنوان طعم‌دهنده

۱ و ۲- استادیاران، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه امل، ایران.

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، موسسه آموزش عالی خزر، محمودآباد، ایران

* - نویسنده مسئول: (Email: azizkhani.maryam@gmail.com)

بود.

مواد و روش

تهیه و آنالیز اسانس‌ها

اسانس‌های مورد استفاده از شرکت Pronarom (بلژیک) تهیه گردیده و در تمام مراحل مطالعه از اتانول ۵۰٪ بعنوان حلال اسانس‌ها استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری و کپک

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز (PTCC 1298) از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. باکتری لیوفلیزه به محیط کشت^۱ BHI Broth منتقل، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و برای حداقل دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت گردید. سپس جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت مرحله دوم مقادیر مختلفی به کووت‌های حاوی ۵ میلی لیتر BHI Broth استریل منتقل شده و با استفاده از قرائت جذب نوری (Abs: 0/175 - 0/190) در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی، کووت حاوی حدود 10^7 cfu/ml جهت تلقیح به نمونه‌های مورد آزمایش مشخص شد (Basti *et al.*, 2007).

کپک *آسپرژیلوس فلاووس* (ATCC 15546) از گروه قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. کپک در محیط کشت^۲ PDA شیب‌دار به مدت ۱۰ - ۷ روز در ۲۶ درجه سانتی‌گراد، جهت تولید اسپور، گرمخانه‌گذاری گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ درصد توپین ۸۰ به لوله حاوی کپک منتقل و سطح کشت جهت برداشتن اسپور با میله شیشه‌ای خمیده استریل، به آرامی خراش داده شد. بمنظور حذف قطعات میسلیوم موجود در سوسپانسیون از فیلتر نایلونی و برای شمارش اسپورهای قارچی از لام نئوبار استفاده شد. غلظت اسپور توسط محلول ۰/۰۵ درصد توپین ۸۰ به ۱۰۶ اسپور در هر میلی‌لیتر رسانده شد (Gandomi *et al.*, 2009).

تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) اسانس‌ها برای لیستریا مونوسیتوژنز MIC به کمترین مقدار از یک ترکیب طلاق می‌شود که می‌تواند بطور قابل توجهی رشد یک ارگانیزم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص (۱۶ تا ۲۰ ساعت بسته به گونه باکتری) مهار نماید. تعیین MIC به روش میکرو دایلوژن با استفاده از غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و گرمخانه‌گذاری در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. پائین‌ترین غلظتی از اسانس که از رشد باکتری و ایجاد کدورت جلوگیری نمود بعنوان MIC تعیین شد.

لینالول، سیترال، اوژنول، سینئول، ژرانیول، کامفور و متیل سینامات از اجزای مهم اسانس ریحان است. جزء اصلی اسانس اغلب گونه‌های ریحان لینالول می‌باشد که میزان آن در اسانس‌ها بین ۴۰ تا ۶۰ درصد است (داوند سراب و همکاران ۱۳۸۷). ترکیبات اسانس مریم گلی و ریحان توسط کمیسیون اروپایی جهت استفاده به‌عنوان طعم‌دهنده بی‌خطر برای سلامت مصرف‌کننده در مواد غذایی به ثبت رسیده است (EC No. 1334/2008).

لیستریا مونوسیتوژنز باکتری میله‌ای شکل و گرم مثبت بوده و در برابر طیف وسیعی از شرایط نامساعد محیطی از جمله ۱۰ درصد نمک و خشکی مقاوم است (Razavilar *et al.*, 1998). عفونت لیستریایی (لیستریوز) اغلب از طریق مصرف آب و غذای آلوده رخ می‌دهد که علائمی شبیه آنفلوآنزا، سپتی سمی و مننژیت مخصوصاً در نوزادان، خانم‌های باردار، افراد مسن و اشخاص دچار نقص سیستم ایمنی ایجاد می‌نماید. تاکنون موارد متعددی از شیوع لیستریوز در انسان توسط مصرف انواع مواد غذایی مانند شیر و فرآورده‌های لبنی گزارش شده است که بیشترین موارد مشاهده شده مربوط به پنیر نرم، نیمه نرم و پنیر سفید می‌باشد (Palmer *et al.*, 2001; Millet *et al.* 2006). عدم کفایت حرارت پاستوریزاسیون در نابودی کامل این باکتری (در صورتی که جمعیت باکتریایی بیش از 10^2 cfu/ml در شیر باشد) (Palmer *et al.*, 2001) و همچنین رشد آن در دمای یخچالی ۴ درجه سانتی‌گراد (نگهداری طولانی مدت پنیرهای آلوده در این دما موجب افزایش تعداد باکتری می‌گردد) اهمیت بررسی این باکتری را بیشتر آشکار می‌سازد (Millet *et al.*, 2006).

قارچ‌ها از عوامل مهم فساد مواد غذایی در طول انبارداری و ذخیره محسوب می‌شوند که به علت پتانسیل تولید مایکوتوکسین‌ها باعث ایجاد خطرات برای سلامت مصرف‌کننده می‌گردند. بهترین شرایط برای رشد و تولید مایکوتوکسین در این قارچ‌ها در محیط‌هایی با حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بیش از ۸۵ درصد است (Gandomi *et al.*, 2009). کنترل قارچ‌ها در صنایع غذایی معمولاً با استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی مانند سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم انجام می‌شود اما این مواد در اغلب موارد دارای اثرات جانبی مثل سرطان‌زایی و تراژوژنیسی (تاثیر منفی بر جنین) ناشی از باقی‌مانده آنها هستند (Mpountoukas *et al.*, 2008). خصوصیات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیزم‌ها، شامل باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها مورد بررسی قرار گرفته اما اغلب این تحقیقات در محیط آزمایشگاهی انجام شده و بدین ترتیب اطلاعات اندکی پیرامون تاثیر آنها طی دوره نگهداری ماده غذایی در دسترس است (Smith *et al.*, 2001). لذا، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان در برابر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و کپک *آسپرژیلوس فلاووس* در یک مدل غذایی (پنیر سفید ایرانی) طی دوره نگهداری

1 Brain Heat Infusion

2 Potato Dextrose Agar

NS: تعداد اسپور در نمونه تیمار شده

تهیه نمونه‌های پنیر و ارزیابی رشد باکتری و قارچ در پنیر

نمونه‌های پنیر سفید ایرانی در یک واحد تولیدی در استان مازندران تهیه شد. پس از انجام مراحل حرارت‌دهی شیر (پاستوریزاسیون در 72 ± 2 درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و سرد کردن شیر تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد)، میزان تلقیح باکتریایی مورد نظر (10^4 باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در هر میلی‌لیتر) به شیر اضافه گردید. رنت یا مایه پنیر توسط پمپ به مخزن رنت‌زنی (میزان مایه پنیر استفاده شده $3/25$ درصد بود) هدایت شده، سپس ترکیبات ضدکف اضافه و در ظروف پلی‌اتیلنی استریل پر شد. در این مرحله غلظت‌های $0/5$ ، $0/75$ و 1 درصد از هر یک از اسانس‌های مریم گلی و ریحان به شیر حاوی باکتری اضافه (نمونه فاقد اسانس بعنوان کنترل در نظر گرفته شد) و به سرعت جهت مخلوط شدن، همزده شد، سپس مجدداً آنتی‌فوم (ضد کف) اسپری گردید. پس از آن مخلوط به تونل انعقاد منتقل شد، زمان عبور از تونل ۱۵ دقیقه بود. سپس ظروف حاوی پنیر به روی نقاله خروجی منتقل و پس از پاشش نمک به میزان $2/5$ درصد و قرار دادن پوشش کاغذی (پارچمنت) روی پنیر، با فویل آلومینیومی دربندی شدند. در مرحله بعدی، تاریخ‌گذاری توسط دستگاه جت پرینتر انجام گرفت. نمونه‌های پنیر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در روزهای ۰، ۱، ۲، ۳ و پس از آن تا روز ۲۱ با فاصله‌های زمانی ۴۸ ساعته جهت شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز روی محیط آگار انتخابی لیستریا (پالکام) مورد آزمایش قرار گرفتند (مشتاقی و همکاران، ۱۳۸۷).

به گروه دیگر از نمونه‌های پنیر (تلقیح نشده با لیستریا مونوسیتوژنز) حاوی غلظت‌های $0/5$ ، $0/75$ و 1 درصد از اسانس‌ها (پس از قرار گرفتن در معرض اشعه فرابنفش به مدت ۳۰ دقیقه و انجام آزمایش جهت اطمینان از عدم وجود آسپیریلوس فلاووس) اسپور کپک آسپیریلوس فلاووس تلقیح شد. بطور خلاصه، جهت ارزیابی رشد قارچ، پنیر به قطعاتی با قطر ۸ میلی‌متر بریده و در یک پلیت قرار شد. ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به مرکز قطعات اضافه و به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. میانگین دو قطر عمود بر هم کلنی قارچی هر ۲۴ ساعت محاسبه شد (Gandomi et al., 2009). پنیر تولیدی حاوی ۱۵ تا ۱۷ درصد چربی و ۱۰ تا ۱۴ درصد پروتئین بود.

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی توسط یک پانل هفت نفره صورت پذیرفت. برای ارزیابی ویژگی‌های حسی نمونه‌های پنیر حاوی غلظت‌های مختلف از اسانس‌های مورد مطالعه از تست پذیرش حسی استفاده شد. برای این

MBC به کمترین غلظت از اسانس اطلاق می‌شود که می‌تواند پس از گذشت ۲۴ ساعت جمعیت باکتریایی را به میزان ۹۹ درصد کاهش دهد. جهت تعیین MBC از غلظت‌هایی که کدورتی در آنها مشاهده نشد در پلیت BHI آگار کشت سطحی داده شد. غلظتی که شمارش تعداد کلونی‌ها در آن صفر بود، بعنوان MBC تعیین شد (عزیزخانی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Tzortzakakis et al., 2007).

تعیین میزان MIC و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس‌ها برای آسپیریلوس فلاووس

محیط مذاب PDA استریل حاوی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها تهیه و به ازای هر غلظت در سه پلیت توزیع شد. یک دیسک ۵ میلی‌متری کاغذ واتمن شماره ۱ در مرکز پلیت قرار داده شد و با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور (حاوی 10^6 اسپور در میلی‌لیتر) تلقیح گردید. پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در ۲۶ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و قطر کلنی هر ۲۴ ساعت اندازه‌گیری گردید تا زمانی که در گروه شاهد (فاقد اسانس) تمام قطر پلیت توسط قارچ پوشانده شد. دیسک‌ها از پلیت‌های فاقد رشد به محیط فاقد اسانس منتقل و همانند بالا گرمخانه‌گذاری شد تا اثر بازدارندگی و قارچ‌کشی تعیین گردد. کمترین غلظتی از اسانس که از رشد کپک جلوگیری نمود بعنوان MIC و پائین‌ترین غلظتی که موجب کشته شدن کپک گردید بعنوان MFC در نظر گرفته شد. همه مراحل در سه تکرار انجام شد (Gandomi et al., 2009). اثر ضدقارچی اسانس‌ها برحسب درصد مهارکنندگی رشد کلنی از فرمول زیر (Soliman et al., 2002) محاسبه گردید:

$$MIC = \frac{Dc - Ds}{Dc} \times 100 \quad (1)$$

Dc: قطر کلونی در شاهد

Ds: قطر کلونی در نمونه تیمار شده

ارزیابی تولید اسپور

$0/1$ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به پلیت‌های PDA حاوی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها تلقیح و در تمام سطح محیط پخش شد. پلیت‌ها در ۲۶ درجه به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند. اسپورهای تولید شده در هر پلیت جمع‌آوری، به ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محلول $0/05$ درصد توپین ۸۰ منتقل و سوسپانسیون به شدت تکان داده شد. تعداد اسپورها در هر سانتی‌متر مربع از پلیت با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. درصد مهارکنندگی تولید اسپور از رابطه زیر محاسبه گردید (Tzortzakakis et al., 2007):

$$I(\%) = \frac{Nc - Ns}{Nc} \times 100 \quad (2)$$

NC: تعداد اسپور در شاهد

بدست آمد (جدول ۲). غلظت ۰/۳۵٪ اسانس مریم گلی کبیر و غلظت ۰/۵٪ اسانس ریحان از تولید اسپور توسط قارچ در محیط کشت جلوگیری نمود (جدول ۲).

جدول ۱- ترکیبات عمده اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان

ترکیب	میزان (درصد)	ترکیب	میزان (درصد)
۱،۸-سینئول	۱/۱۴	آلفا- پینن	۴/۵۷
لینالول	۵۸/۶۳	لیمونن	۱/۵۵
کامفور	۳/۱۱	۱ و ۸- سینئول	۲/۲۹
آلفا- تریپینول	۱/۰۷	لینالول	۱۸/۱۸
بتا- کاریفیلین	۱/۴۰	آلفا- تریپینول	۵/۰
آلفا- برگاموتین	۷/۶۲	لینالیل استات	۵۲۰/۸۳
ژرماکریل دی	۲/۰۵	بتا- کاریفیلین	۱۰/۸۳
گاما- کادینن	۴/۹۲	بتا- میرسین	۱/۰۱
ویریدیفلورول	۳۱/۶	بتا- تریپینول	۱/۱۹
کادینول (آبی مر آلفا)	۱۰/۰۱	-	-

جدول ۲- تاثیر اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان بر رشد و تولید اسپور توسط اسپیرژیلیوس فلاووس در محیط کشت

غلظت اسانس (%)	رشد		تولید اسپور
	قطر هاله کلنی (mm)	بازداری (%)	
مریم گلی کبیر			
۰	۱۰۲ ± ۱/۵ ^a	۱۰۲ ± ۰/۲ ^a	۰
۰/۳	۷۵/۲ ± ۱/۹	۲۶/۲ ^b	۶۵/۷ ^b
۰/۳۵	۴۹ ± ۰/۸	۵۱/۹ ^c	۱۰۰ ^c
۰/۴۰	۳۳/۱ ± ۲/۶	۷۷/۳ ^d	۱۰۰ ^c
۰/۴۵	۵/۳ ± ۰/۷	۹۴/۸ ^e	۱۰۰ ^c
۰/۵۰	فاقد رشد	۱۰۰ ^f	۱۰۰ ^c
۰/۵۵	فاقد رشد	۱۰۰ ^f	۱۰۰ ^c
۰/۶۰	فاقد رشد	۱۰۰ ^f	۱۰۰ ^c
۰/۶۵	فاقد رشد	۱۰۰ ^f	۱۰۰ ^c
ریحان			
۰	۱۰۲ ± ۱/۵ ^a	۱۰۲ ± ۰/۲ ^a	۰
۰/۴۵	۹۱/۵ ± ۲/۲	۱۰/۲ ^b	۴۸/۹ ^b
۰/۵۰	۶۸/۶ ± ۱/۳	۳۲/۷ ^c	۱۰۰ ^c
۰/۵۵	۳۳/۲ ± ۱/۵	۶۷/۴ ^d	۱۰۰ ^c
۰/۶۰	فاقد رشد	۱۰۰ ^e	۱۰۰ ^c
۰/۶۵	فاقد رشد	۱۰۰ ^e	۱۰۰ ^c
۰/۷۰	فاقد رشد	۱۰۰ ^e	۱۰۰ ^c
۰/۷۵	فاقد رشد	۱۰۰ ^e	۱۰۰ ^c
۰/۸۰	فاقد رشد	۱۰۰ ^e	۱۰۰ ^c

اسانس مریم گلی کبیر تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد لیستریا مونوسیژنوز در پنیس نشان داد (p < ۰/۰۵) بطوری که غلظت ۰/۷۵٪

منظور پنیس فاقد میکروارگانیسم، تهیه شده با غلظت‌های مختلف اسانس‌های مورد مطالعه به هفت قسمت تقسیم گردید. اعضای پانل معیارهای ارزیابی حسی (شامل طعم، بو و قوام) پنیس حاوی غلظت‌های مختلف اسانس‌های ریحان و مریم گلی را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد، نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و در نهایتاً نمره ۱ فوق العاده بد، لحاظ گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

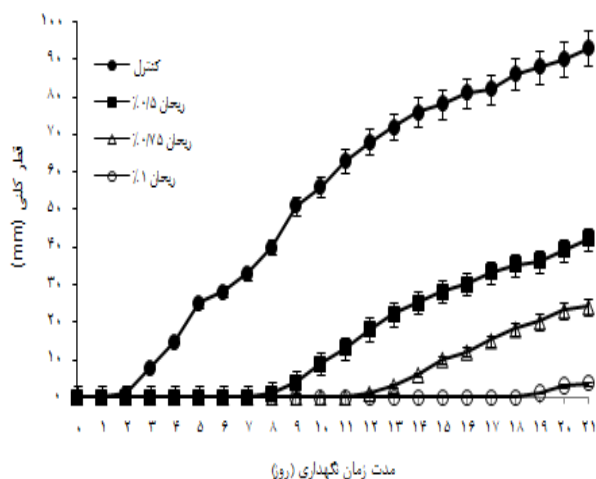
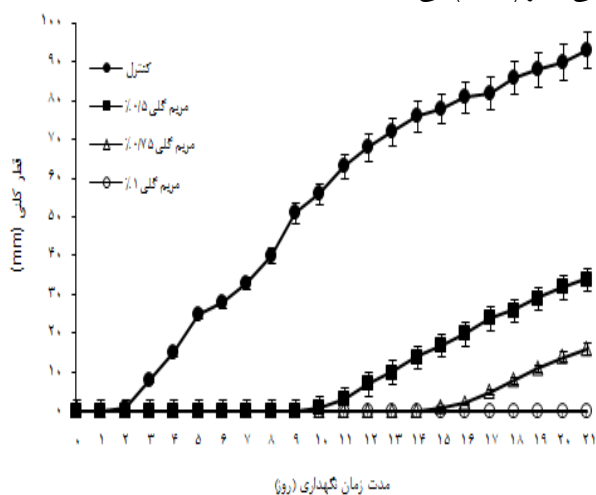
این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار سطح مختلف از دو اسانس ریحان و مریم گلی، صفر ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد، اجرا شد. داده‌های تجربی با استفاده از نرم افزار SPSS 19.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار مستقل نشان داده شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس (p < ۰/۰۵) تحلیل و تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها توسط تست چند دامنه ای دانکن مشخص گردید.

نتایج و بحث

افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به ترکیبات ضد میکروبی سنتزی مورد استفاده در مواد غذایی که تاثیرات سوء بر سلامت مصرف کننده می گذارد، سبب تلاش هر چه بیشتر محققان جهت یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید و حتی الامکان طبیعی، همانند انواع گیاهان دارویی، گردیده است. اسانس‌های گیاهی منابع بالقوه ترکیبات ضد میکروبی می باشند (Bagamboula et al., 2004). ترکیبات طبیعی مشتق شده از گیاهان از گذشته در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد در مواد غذایی بکار رفته اند (Valero & Salmeron, 2003). درصد ترکیبات مهم اسانس‌های مورد استفاده در این مطالعه (که توسط GC و GC/MS تعیین شد) در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. طبق نتایج GC/MS، ۲۳ ترکیب برای اسانس ریحان و ۳۴ ترکیب برای اسانس مریم گلی کبیر شناسایی شد. مطابق نتایج حاضر، ترکیب اصلی اسانس مریم گلی شامل لینالیل استات (۵۲/۸۳٪)، لینالول (۱۸/۱۸٪) و آلفا-تریپینول (۵٪) و اسانس ریحان شامل لینالول (۵۸/۶۳٪)، آلفا-کادینول (۱۰/۰۱٪) و آلفا-برگاموتین (۷/۶۲٪) بود.

MIC و MBC اسانس مریم گلی کبیر معادل به ترتیب ۰/۰۱۵٪ و ۰/۰۲٪ و اسانس ریحان برابر با، به ترتیب، ۰/۰۵٪ و ۰/۰۶٪ در برابر لیستریا مونوسیژنوز بود. همچنین، MIC و MFC در برابر اسپیرژیلیوس فلاووس برای اسانس مریم گلی کبیر معادل، به ترتیب، ۰/۰۵٪ و ۰/۰۶۵٪ و برای اسانس ریحان برابر با ۰/۰۸٪ و ۰/۰۶٪

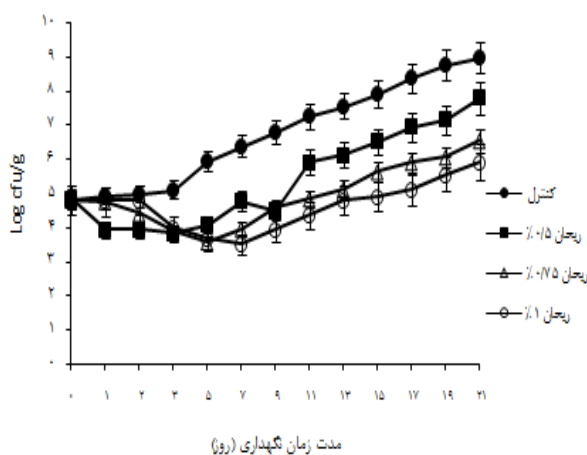
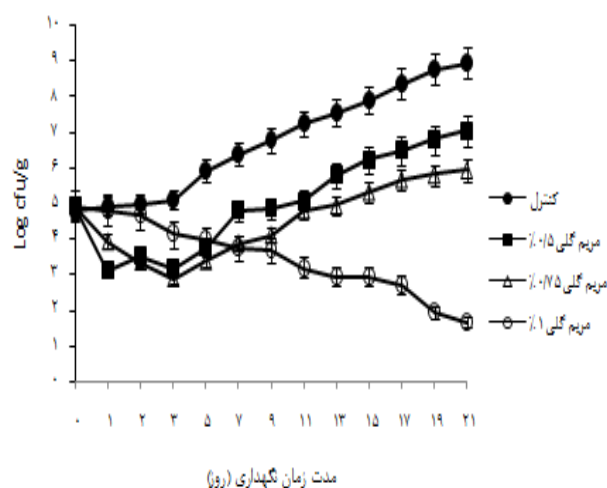
که غلظت ۰/۵٪ اسانس مریم گلی کبیر تا ۹ روز از رشد کپک بازداری نمود و در غلظت ۰/۷۵٪ این اسانس تا روز چهاردهم هیچ رشدی مشاهده نشد و پس از آن نیز سرعت رشد نسبت به نمونه شاهد بطور قابل ملاحظه‌ای کمتر بود ($p < 0/05$). در غلظت ۰/۷۵٪ اسانس مریم گلی کبیر، مهار رشد کپک در مقایسه با شاهد به ۸۲/۸٪ در آخرین روز دوره نگهداری پنیر (روز ۲۱) رسید. غلظت ۱٪ دارای ۱۰۰٪ اثر مهارکنندگی بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بوده و طی ۲۱ روز دوره نگهداری هیچ رشدی از کپک در نمونه پنیر مشاهده نشد. اسانس ریحان در مقایسه با اسانس مریم گلی کبیر دارای فعالیت ضدقارچی کمتری بوده ($p < 0/05$) اما بطور کلی، رشد کپک را تا ۱۱ روز در غلظت ۰/۷۵٪ و تا ۱۸ روز در غلظت ۱٪ مهار نمود. اثر مهارکنندگی غلظت ۱٪ اسانس ریحان در روز ۲۱ برابر با ۹۶/۲٪ بود که دارای اختلاف معنی‌داری با اثر بازدارندگی غلظت ۱٪ اسانس مریم گلی کبیر (۱۰۰٪) می‌باشد ($p < 0/01$).



شکل ۲- تاثیر اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در پنیر

گیاهان خانواده نعناع به سبب دارا بودن ترکیبات ترپنوئیدی

و ۱٪ اسانس در مقایسه با نمونه شاهد، جمعیت لیستریایی را، به ترتیب، بیش از ۳ log cfu/g و ۶ log cfu/g در آخرین روز دوره نگهداری پنیر (روز ۲۱) کاهش داد ($p < 0/05$). (شکل ۱). همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تاثیر بازدارندگی اسانس ریحان در مقایسه با اسانس مریم گلی کبیر در برابر باکتری لیستریا مونوسیوتونز در پنیر طی دوره ۲۱ روزه نگهداری به طور قابل ملاحظه‌ای پائین‌تر بود ($p < 0/05$). با این حال، قابلیت بازداری غلظت ۱٪ اسانس ریحان جمعیت لیستریایی را نسبت به نمونه شاهد اندکی بیش از ۳ log cfu/g کاهش داد ($p < 0/05$).



شکل ۱- تاثیر اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان بر رشد لیستریا مونوسیوتونز در پنیر

مطابق شکل ۲، تمام غلظت‌های مورد استفاده اسانس‌ها دارای اثر مهارکنندگی بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بودند ($p < 0/05$). نتایج حاصل نشان می‌دهد که این تاثیر دارای الگوی وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت اسانس‌ها اثر مهارکنندگی افزایش می‌یابد، بطوری

میزان \log ۱ کاهش داد و از این روز به بعد باکتری از نمونه جدا نشد. همچنین در مطالعه مشاک و همکاران (۱۳۸۷) غلظت ۰/۰۱۵٪ اسانس آویشن شیرازی موجب کاهش رشد لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر سفید ایرانی و در مطالعه Vrinda و همکاران (۲۰۰۱)، غلظت ۱-۰/۵٪ اسانس میخک موجب کاهش رشد لیستریا مونوسیتوژنز به میزان \log ۳-۱ در پنیر موزارلا گردید. احتمال می‌رود با توجه به روند کاهش رشد باکتری با افزایش غلظت اسانس، استفاده از غلظت‌های بالاتر از ۱٪ اسانس مریم گلی کبیر موجب توقف کامل تکثیر یا کشتن باکتری گردد لیکن ممکن است باعث ایجاد طعم نامطلوب در پنیر شود.

کپک‌ها از مهمترین عوامل فساد در انواع پنیر می‌باشند (Elsie *et al.*, 2014) در مطالعه حاضر، قطر کلنی آسپریلیوس فلاووس در نمونه پنیر شاهد به ۹۳ mm در پایان دوره ۲۱ روزه نگهداری در ۲۶ درجه سانتی‌گراد رسید، در حالی که قطر کلنی در نمونه حاوی ۱٪ اسانس ریحان ۳/۵ mm بود. هیچ رشدی از آسپریلیوس فلاووس در نمونه حاوی ۱٪ اسانس مریم گلی کبیر در کل دوره نگهداری مشاهده نشد. فعالیت اسانس‌های مختلف در بازداری از رشد و اسپورزایی قارچ‌ها در مطالعات قبلی گزارش شده است (Gandomi *et al.*, 2009; Kuate *et al.*, 2006; Pawar and Thaker, 2006) و همکاران Tataoui-Elaraki (۱۹۹۳) در تحقیقات اولیه خود تاثیر سه اسانس مراکشی را بر تولید اسپور قارچی بررسی و گزارش نمودند که بخشی از فعالیت بازداری از تولید اسپور می‌تواند به تخریب میسیلیوم و بازداری از رشد قارچ مربوط باشد. Mahanta و همکاران (۲۰۰۷) پیشنهاد نمودند که تاثیر اسانس‌ها بر تولید اسپور، حاصل پخش شدن ترکیبات فرار اسانس در سطح میسیلیوم و آسیب به آن می‌باشد. در مطالعه دیگر، غلظت ۰/۱٪ اسانس آویشن شیرازی، در مقایسه با نمونه شاهد، به میزان ۷۵/۴٪ از رشد و تولید اسپور توسط آسپریلیوس فلاووس در پنیر سفید ایرانی بازداری نمود (Gandomi *et al.*, 2009) در مطالعه حاضر، اسانس مریم گلی کبیر فعالیت ضد میکروبی بیشتری از اسانس ریحان نشان داد. مطابق جدول ۱، ترکیبات اصلی اسانس مریم گلی کبیر لینالیل استات و لینالول و ترکیبات اصلی اسانس ریحان شامل لینالول بود. مطالعات Tadtong و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که لینالیل استات و لینالول در حضور یکدیگر تاثیر سینرژیستی ضد میکروبی نشان داده و نیز موجب افزایش تاثیر سایر ترکیبات فعال نیز می‌گردند. علت تاثیر ضد میکروبی قوی‌تر اسانس مریم گلی کبیر نسبت به اسانس ریحان می‌تواند به وجود توأم این دو ترکیب در مجموعه ترکیبات گیاه مریم گلی مربوط باشد.

مطابق نتایج آزمون‌های حسی، غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱ درصد اسانس ریحان در پنیر، از لحاظ شاخص طعم بالاترین امتیاز پذیرش را از نظر اعضای گروه پانل دریافت کردند. اسانس ریحان در مقایسه با اسانس مریم گلی کبیر امتیاز بالاتری از لحاظ شاخص‌های حسی

گونگون، اسانس و ترکیبات فنلی از جنبه اثرات ضد میکروبی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته اند. مطالعه حاضر فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان را در محیط کشت و در مدل غذایی (پنیر) آشکار ساخت. فعالیت ضد لیستریایی برخی از اسانس‌ها در محیط کشت و در نمونه‌های غذایی در تحقیقات پیشین گزارش شده است (Abdollahzadeh *et al.*, 2014; Saddam, 2013; Sandasi *et al.*, 2008). همچنین، فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های مریم گلی و ریحان در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد، مانند استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس ائروجینوزا، شیگلا دیسانتری، باسیلوس سرئوس، پروتئوس وولگاریس، اشرشیاکلی، گونه‌های ویبریو، سالمونلا تیفی موریوم و چند مخمر و کپک، با حداقل غلظت بازدارندگی $2/5-0/5$ ٪ برای مریم گلی (Kuzma *et al.*, 2009; Perini *et al.*, 2014) و $5-0/3$ ٪ برای ریحان (Adeola *et al.*, 2012; Adiguzel *et al.*, 2005; Moghaddam *et al.*, 2011) مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. عمده این مطالعات در شرایط آزمایشگاهی انجام و کمتر به نمونه‌های غذایی پرداخته شده است. در این مطالعه، اثر ضد لیستریایی اسانس مریم گلی کبیر قوی‌تر از اسانس ریحان بود. مقدار اسانس لازم برای اعمال تاثیر مهارکنندگی و کشندگی برای باکتری و کپک متفاوت بود و بطور مثال MIC بدست آمده برای کپک بسیار بالاتر از MIC باکتری در مورد هر دو اسانس بود. بطور کلی تاثیر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر رشد میکروارگانیسم‌ها نشان داد که باکتری در مقایسه با کپک در برابر اسانس‌های مورد استفاده در این مطالعه حساس‌تر است که این نتیجه با نتایج ایزدی و همکاران (۱۳۸۸) و Sing (۲۰۰۰) منطبق است.

با وجود اینکه اسانس ریحان از رشد هیچ کدام از دو میکروارگانیسم مورد بررسی بطور کامل بازداری نکرد، لیکن این اسانس رشد و تکثیر لیستریا مونوسیتوژنز را به خصوص در غلظت ۱٪ در پنیر محدود نمود. غلظت ۰/۷۵٪ و ۱٪ اسانس ریحان به ترتیب تا روز هفتم و نهم رشد باکتری را کاهش داده و پس از این مدت باکتری مجدداً شروع به تکثیر نمود. علت این امر ممکن است به خارج شدن ترکیبات ضد میکروبی فرار از بافت پنیر مرتبط باشد. در زمینه ایمنی مواد غذایی، ایجاد چنین تاخیری در رشد میکروارگانیسم طی نگهداری کوتاه مدت محصولات غذایی مفید بنظر می‌رسد زیرا در نگهداری طولانی مدت بدون حضور عوامل ضد میکروبی، جمعیت لیستریایی به سطح بالایی خواهد رسید. غلظت ۱٪ اسانس مریم گلی کبیر بطور قابل ملاحظه‌ای رشد لیستریا مونوسیتوژنز را در پنیر نسبت به نمونه شاهد کاهش داد (بیشتر از \log ۶) اما در این غلظت قادر به کشتن کل جمعیت باکتری در مدل غذایی نبود. در سایر مطالعات، غلظت ۰/۰۴٪ اسانس زیره سبز (فضل آرا و همکاران، ۱۳۹۱) جمعیت لیستریا مونوسیتوژنز را در پنیر سفید ایرانی پس از ۱۵ روز نگهداری به

ضروری بنظر می‌رسد.

قدردانی

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرننت) دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل انجام شده است. بدینوسیله از حمایت های مالی معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل صمیمانه قدردانی می شود .

داشت. نتایج مطالعه نشان می‌دهد که کاربرد اسانس مریم گلی کبیر یا اسانس ریحان در پنیر سفید ایرانی، می تواند سبب سلامت این فرآورده و کاهش رشد لیستریا مونوسیٹوژنز و آسپرژیلوس فلاووس در پنیر گردد. لازم به ذکر است که انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه بخصوص استفاده توام انواع اسانس های گیاهی با توجه به ترکیبات تشکیل دهنده جهت بهره گیری از تاثیر تقویت کنندگی و سینرژیستی آنها بمنظور ممانعت از رشد پاتوژن ها در مدل های غذایی و نیز بررسی تاثیر این اسانس ها بر ویژگی های ارگانولپتیکی انواع مواد غذایی

منابع

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. & Hosseini, H., 2014, Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177-183.
- Adeola, S.A., Folorunso, O.S. & Amisu, K.O., 2012, Antimicrobial Activity of *Ocimum Basilicum* and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of *Salmonella typhimurium*. *Research Journal of Biology*, 2, 138-144.
- Adiguzel, A., Gulluce, M., Sengul, M., Ogutcu, H., Sahin, F. & Karaman, I., 2005, Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. *Turkish Journal of Biology*, 29, 155-160.
- Azizkhani, M., Misaghi, A., Akhondzadeh Basti, A., Gandomi Nasrabadi, H. & Hosseini, H., 2012, Effect of *Zataria* essential oil on growth and enterotoxin E production of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Journal of Medicinal Herbs*, 4(44), 184-193.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. & Debevere, J., 2004, Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S.flexeneri*. *Food Microbiology*, 21, 32-42.
- Bart, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223 -253.
- Basti, A.A., Misaghi, A. & Khaschabi, D., 2007, Growth response and modeling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Technology*, 40, 973-981.
- Davandsarab, M., Naghdibadi, H., Nasri, M., Makizadeh, M. & Omid, H., 2008, Changing of essential oil content and function of *Ocimum basilicum* affected by density and nitrogen fertilizer. *Journal of Medicinal Herbs*, 3(27), 60-70.
- Elsie, Y.L., Cheong, A.S., Jayaram, J., Thu, T.K.L., Nhiep, N.T., Huong, T.M.H., Zwielehner, J., Nidhi, B., Bansal, M. & Turner, S., 2014, Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91-97.
- Fazlara, A., Sadeghi, A. & Soleimani, P., 2012, Antibacterial effect of cumin essential oil on *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 9(35), 35-43.
- Gandomi, H., Misaghi, A., Basti, A.A., Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A. & Jebelli Javan, A., 2009, Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. *Food and chemical toxicology*, 47, 2397- 2400.
- Izadi, Z., Ahmadvand, G., Asnaashari, M., Piri, k. & Davoodi, P., 2009, Biochemical and antimicrobial activity of salvia and peppermint essential oils. *Journal of Armagh Danesh*, 16(1), 19-29.
- Kazemizadeh, Z., Habibi, Z., Yusefzadeh, M., Ashabi, M. & Heidari Reikan, M., 2009, Chemical composition and antibacterial activity of salvia essential oil planted in West Azerbaijan province. *Journal of Medicinal Herbs*, 1(33), 75-82.
- Kuate, J., Foko, J., Ndindeng, S.A., Jazet-Dongmo, P.M., Foure, E., Damesse, F., Manga, B. & Ducelier, D., 2006, Effect of essential oils from citrus varieties on in vitro growth and sporulation of *Phaeoramularia angolensis* causing citrus leaf and fruit spot disease. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 151-161.
- Kuźma, L., Kalemba, D., Różalski, M., Różalska, B., Więckowska-Szakiel, M., Krajewska, U. & Wysokińska, H., 2009, Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from *Salvia sclarea*. *Plants Regenerated in vitro*. *Molecules*, 14, 1438-1447.
- Mahanta, J.J., Chutia, M., Bordoloi, M., Pathak, M.G., Adhikary, R.K. & Sarma, T.C., 2007, *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. spawns. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 525-530.

- Mashak, Z., Moradi, B., AkhondzadrhBasti, A., Abbasifar, A. & Gandomi, H., 2008, *Listeria monocytogenes* behavior during production of Iranian white cheese containing zataria essential oil, *Journal of Medicinal Herbs*, 1(29), 115-122.
- Millet, L., Saubusse, M., Didiene, R., Tessier, L. & Montel, M.C., 2006, Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *Food Microbiology*, 108 (1), 105-114.
- Moghaddam, A.M.D., Shayegh, J., Mikaili, P. & Shara., J.D., 2011, Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15), 3453-3456.
- Moshtaghi, H. & Bonyadian, M., 2008, Antilisterial effect of *Menthaspicata* essential oil in a food model, *Journal of Medicinal and Aromatic plants*, 3(24), 326-332.
- Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E. & Lialiaris, T., 2008, Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2390-2393.
- Palmer, A.S., Stewart, J. & Fyfe, L., 2001, The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463-470.
- Pawar, V.C. & Thaker, V.S., 2006, In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49, 316-323.
- Perini, S., Piccoli, R.H., Nunes, C.A., Bruhn, F. R. P., Custódio, D. A. C. & Costa, G. M., 2014, Antimicrobial activity of essential oils against pathogens isolated from Bovine Mastitis. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4 (2), 1-6.
- Razavilar, V. & Genigeorgis, C., 1998, Prediction of *Listeria* spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in model broth. *Food Microbiology*, 40, 149 - 157.
- Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council on flavorings and certain food ingredients with flavoring properties for use in and on foods.
- Saddam, S., 2013, Efficacy of Fir and Qysoom essential oils, alone and in combination, in controlling *Listeria monocytogenes* in vitro and in RTE meat products model. *Food Control*, 34(2), 657-661.
- Sandasi, M., Leonard, C.M. & Viljoen, A.M., 2008, The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19(11), 1070-1075.
- Sing, M., 2000, Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. *Flavour and Fragrance Journal*, 31, 175-179.
- Smith, P., Stewart, J. & Fyfe, L., 2001, The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463- 470.
- Soliman, K.M. & Badeaa, R.I., 2002, Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669-1675.
- Tadtong, S., Suppawat, S., Tintawee, A., Saramas, P., Jareonvong, S. & Hongratanaworakit, T., 2012, Antimicrobial activity of blended essential oil preparation. *Natural Product Communications*, 7(10), 1401-1404.
- Tataoui-Elaraki, A., Ferhout, H. & Errifi, A., 1993, Inhibition of fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 5, 535-545.
- Tzortzakis, N.G. & Economakis, C.D., 2007, Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 253-258.
- Valero, M. & Salmeron, M.C., 2003, Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 73-81.
- Vrinda, M.K. & Grag, R., 2001, Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monositogens* in meat and Cheese. *Food Microbiology*, 18, 647 - 650.

Effects of *Ocimum basilicum* and *Salvia sclarea* essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus flavus* in Iranian white cheese

M. Azizkhani^{1*}, F. Tooryan², M. Boreiri³

Received: 2014.09.08

Accepted: 2014.12.25

¹Introduction: Mold growth on cheese is a common problem for cheese manufacturers during ripening and curing, as well as for the retailer and consumer during refrigerated storage. *Listeria monocytogenes* has gained increasing attention as a pathogen of public health importance owing to large numbers of foodborne outbreaks of listeriosis. Ingested by mouth, *Listeria* is among the most virulent of foodborne pathogens with up to 20% of clinical infections resulting in death. Various types of foods, mostly dairy products such as cheese, have been associated with these outbreaks and there is considerable interest in stopping this upward trend. As a result of the negative consumer perception of chemical preservatives, attention is shifting towards natural alternatives. A technique that has been used since ancient times to prevent fungal growth on foods such as cheese involves physically rubbing the product with certain herbs or spices or their oils. Therefore, regarding to the harmful effects of synthetic preservatives on consumers' health, there is an increasing attention, both in food industry and authorities, to medicinal and aromatic plants as natural preservatives in food products. In this research, the effect of salvia and basil essential oils (EOs) on *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus flavus* in Iranian white cheese has been investigated.

Materials and method: Commercially available EOs from basil and salvia were used in this study (Pranarôm International, Ghislenghien, Belgium). EOs were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). A broth microdilution assay was employed to determine the lowest concentration (MIC) in which visible growth of the bacterium is inhibited. The concentration of EO present in those wells that yielded plates with no visible colonies was considered to be the minimum bactericidal concentration (MBC). The effects of EOs on radial growth of fungal mycelium were assayed using an agar dilution method. The lowest concentration which inhibited the growth of the fungus was considered to be the minimum inhibitory concentration (MIC) whereas the lowest concentration of EO which killed the fungus (no growth observed on fresh medium) was taken to be minimum fungicidal concentration (MFC). Iranian ultra-filtered white cheese was produced in a commercial factory with different concentrations of EOs and the effects of EOs on bacterial and fungal growth in cheese during shelf-life were determined. Also, eight trained panellists performed sensory analyses. The panellists scored for colour, odour, flavour, overall acceptability and texture using a 9-point hedonic scale (1, dislike extremely to 9, like extremely).

Results and Discussion: Main components of salvia EO included linalyl acetate and linalool and of basil EO consisted of linalool and α -cadinol. The MIC and MBC of salvia were obtained %0.015 and %0.02 and of basil %0.05 and %0.06, respectively, against *L. monocytogenes*. In the current report, *L. monocytogenes* was neither eliminated nor completely inhibited by basil EO, but salvia EO was able to inhibit its proliferation in cheese. The effect was even more pronounced with 1% salvia oil compared to 0.5% or 0.75%. Basil EO at a concentration of 1% caused a 7-day delay in the growth of *L. monocytogenes*. A growth delay of this type is particularly useful in terms of food safety for the short-term storage of products but not on prolonged storage as *Listeria* may reach high levels in foods over longer periods. MIC and MFC of salvia were %0.5 and %0.65, and of basil % 0.6 and %0.8, respectively, against *A. flavus*. At %0.35 and %0.5 the sporulation was inhibited by salvia and basil EOs, respectively. In the present study, no growth of *A. flavus* was observed in the presence of 1% of salvia EO, and colony diameter attained less than 5mm by the 21st day of cold storage in cheese samples treated with 1% basil EO. Also, the bacterial growth reduced up to 6 log cfu/g of cheese. EO of basil showed weaker antimicrobial effect compared to salvia EO. Cheese samples with different concentrations of EOs were

1 And 2- Assistant Professors, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

3- Msc student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Khazar Institute of Higher Education, Mahmoudabad, Iran.

(*Corresponding author: azizkhani.maryam@gmail.com)

evaluated and compared to the control sample to ascertain consumer acceptability for it. Significant differences were detected among samples containing EOs and the control sample in odour, color and texture, but the samples containing 0.75% and 1% of salvia EO were significantly impaired in both odour and taste as compared with the other samples. With regard to the overall acceptability, the cheese sample containing 0.75% of basil EO was the highest acceptable sample. Generally, it is well known that in complex systems such as cheese, several ingredients interact with each other and affect the sensory properties.

In conclusion, the EO of salvia showed the greatest effect on limiting microbial growth. Both EOs could have potential for commercial use in improving the preservation of these products without the need for propionates or other synthetic additives. Further research could examine the utility of the combined application of basil and salvia EOs in different dairy products such as different types of cheese, as well as the use of different quantities/ratios for optimization of their antimicrobial effects.

Keywords: Cheese, *Ocimum basilicum*, *Salvia sclarea*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus flavus*

مقایسه خواص ضداکسایشی زرشک تازه (*Berberis integerrima*×*Vulgaris*)

در حلال‌های آبی و الکلی

فریده شریفی^۱، لطیفه پوراکیب^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۴

چکیده

گیاه زرشک (*Barberry*) متعلق به خانواده‌ی *Berberidaceae* می‌باشد که به دلیل اثرات کاهش قند و فشار خون در طب سنتی استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی مقایسه‌ای مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، سنجش قدرت احیای آهن، سنجش MDA، توان گیرندگی رادیکال نیتریک اکساید در عصاره‌های الکلی و آبی زرشک (*Berberis integerrima*×*Vulgaris*) بود. بعد از جمع‌آوری میوه زرشک در آبان ۱۳۹۱ از منطقه قمچقay واقع در ۴۵ کیلومتری شهرستان بیجار استان کردستان تا زمان سنجش در فریزر نگهداری شد. سپس عصاره اتانولی، متانولی و آبی آن تهیه گردید. سنجش میزان فنل و فلاونوئید تام به روش اسپکتروفتومتری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از توانایی مهار رادیکال‌های DPPH، نیتریک اکسید، قدرت احیاکنندگی و ظرفیت مهار پراکسیداسیون چربی به روش تیو باربیتوریک اسید صورت گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره آبی دارای بیشترین میزان فنل ($48/98 \pm 0/49$ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و قدرت گیرندگی رادیکال نیتریک اسید ($64/56 \pm 723/6$ درصد) و عصاره متانولی حاوی بیشترین میزان فلاونوئید ($1/93 \pm 0/033$ ، میلی‌گرم در گرم وزن تر)، مهارکنندگی رادیکال DPPH ($0/99 \pm 44/62$ درصد)، قدرت احیای آهن ($5/89 \pm 0/42$ میلی‌مول در گرم وزن تر) و مالون دی آلدئید ($37/12 \pm 0/79$ میلی‌مول بر گرم وزن تر) بود. نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی و الکلی زرشک می‌توانند بعنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی عمل نموده و پس از آزمایش‌های تکمیلی در صنایع غذایی و دارویی بکار روند.

واژه‌های کلیدی: زرشک تازه، فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، خواص ضداکسایشی

مقدمه

طبیعی ترکیبات فنلی گیاهان می‌باشند (Shahidi, 2000). ترکیبات فنلی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند (Ahmadi et al., 2007). آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی که بیشترین استفاده را در صنعت غذایی دارند، شامل: بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، ترشیری بوتیل هیدروکینون (TBHQ) و پروپیل گالات بوده که سرطان‌زایی و اثرات منفی این مواد بر سلامت انسان مشخص شده است (Kahl and Kappus, 1993; Namiki, 1990). بنابراین امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان دارویی و ترکیبات فنلی آن‌ها بعنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند مورد توجه محققین قرار گرفته است (Kulisic et al., 2004). برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از بافت‌های گیاهی می‌توان از حلال‌های مختلف و روش‌های متعدد عصاره‌گیری استفاده کرد. درجه قطبیت حلال‌های مختلف، میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنلی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تحقیقات نشان داده است که حلال‌های اتانول و متانول بصورت مخلوط با آب توانایی بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنلی از بافت‌های گیاه

واکنش‌های بیوشیمیایی متعددی در بدن، اکسیژن فعال تولید نموده که توانایی تخریب بیومولکول‌ها را دارا می‌باشند. این اثر زیان بخش رادیکال‌های آزاد می‌تواند توسط مواد آنتی‌اکسیدان بلوکه شود. آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌ها یا ترکیباتی هستند که بعنوان از بین برنده‌ی رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند که این رادیکال‌ها باعث می‌شوند تا مولکول‌ها آسیب ببینند یا عملکرد خود را از دست بدهند. نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به خوبی، به اثبات رسیده است (Kumaran and Karunakaran, 2006). دفاع اولیه در برابر این تخریب‌های اکسیداتیو بر عهده آنتی‌اکسیدان‌هاست (Valko et al., 2006). گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند، می‌توانند سلول‌ها را از استرس‌های اکسیداتیو محافظت نمایند (Ielpo et al., 2000). یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

* - نویسنده مسئول: (Email: lpourakbar@yahoo.com)

نشان دادند هر دو گونه‌ی فوق دارای مقادیر بالایی از ترکیبات فنلی و آنتوسیانین می‌باشند. در این تحقیق بر روی زرشک هیبرید بین گونه‌های *Berberis integerrima* × *Vulgaris* مطالعه شد. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای بر روی زرشک هیبرید در ناحیه‌ی قمچقای صورت نگرفته است لذا، هدف اصلی از این مطالعه تعیین بهترین حلال جهت استخراج عصاره، بررسی میزان ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌رادیکالی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف میوه‌ی تازه‌ی زرشک جمع‌آوری شده از منطقه‌ی قمچقای شهرستان بیجار در استان کردستان بوده است.

مواد و روش

جمع‌آوری گیاه

هیبرید *Berberis integerrima* × *Vulgaris* در آبان ماه سال ۱۳۹۱ از منطقه قمچقای شهرستان بیجار جمع‌آوری گردید و تا زمان سنجش در فریزر نگهداری شد.

استخراج عصاره

بمنظور بررسی اثر حلال، مقایسه نتایج میان حلال‌های آلی و قطبی و انتخاب بهترین حلال جهت استخراج عصاره عملیات استخراج با حلال‌هایی با قطبیت متفاوت انجام شد. جهت تهیه عصاره از حلال‌های اتانول، متانول و آب استفاده شد. عصاره‌های مختلف گیاه مورد مطالعه به روش خیساندن (maceration) تهیه شد. به این صورت که مقدار ۲ گرم میوه تازه زرشک را درون ارلن ریخته و بطور جداگانه ۱۰ ml حلال مورد نظر (اتانول، متانول و آب) به آن اضافه گردید. مخلوط حاصله به مدت ۲ ساعت با همزن (شیکر) همزده شد. میوه زرشک قبل از اختلاط با حلال کاملاً خرد گردید. پس از آن با عبور مخلوط از کاغذ صافی عصاره اولیه حاصل گردید. این عمل با افزودن ۱۵ ml حلال به مواد باقی مانده تکرار شد.

تعیین مقدار ترکیبات فنلی تام

جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی تام از معرف Folin-Ciocalteو استفاده شد (McDonald et al., 2001). ۱ میلی‌لیتر از این معرف به ۱ میلی‌لیتر عصاره بدست آمده گیاهی اضافه و سپس به مخلوط حاصل ۱ میلی‌لیتر سدیم کربنات اضافه شد پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل APPEL خوانده شد. نتایج، با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید به صورت میلی‌گرم هم‌ارز گالیک اسید بر گرم وزن تر گزارش شد (Shui and Leong, 2002; Pandjaitan et al., 2005).

دارند (Suzuki et al., 2002). ایران از نظر پوشش و تنوع گیاهی دارای منابع بی‌ظنری است و طب سنتی ایران نیز یکی از غنی‌ترین و پربافت‌ترین طب‌های سنتی دنیا بشمار می‌رود.

خانواده *Berberidaceae* گروهی از گیاهان می‌باشند که از میان آنها چند نمونه مثل *Berberis Aristata*، *Berberis Integerrima* و *Berberis Vulgaris* دارای مصارف قابل توجهی در پزشکی و صنعتی می‌باشند. ترکیبات موجود در زرشک دارای فعالیت‌های بیولوژیکی هستند و بطور گسترده‌ای در صنایع غذایی و پزشکی کاربرد دارند (Martynov et al., 1984).

بر اساس مطالعاتی که بر روی عصاره‌ی ریشه‌ی زرشک و عمده‌ترین آلکالوئید آن یعنی بربرین انجام گرفته خواص زیر برای آن ذکر شده است: آنتی‌اکسیدان (Sabir et al., 1978)، ضدالتهاب (Ivanovska and Phlipov, 1999)، کاهنده‌ی فشار خون (Fatehi et al., 2005)، هیپوگلیسمی (Yin et al., 2002) و پایین‌آورنده‌ی چربی (Doggrell, 2005). عصاره‌ی زرشک حاوی انواع فلاونوئیدها از جمله کوئرستین، کریسانتین، هایپروزید، دلفینیدین-۳-O-بتا-D-گلوکوزید، پلارگونین و پتیونیدین-۳-O-بتا-D-گلوکوزید است (Gilgun-Sherki et al., 2001)، همچنین دارای ترکیباتی نظیر آسکوربیک اسید، آلفاتوکوفرول و بتاکاروتن است که همگی جزء آنتی‌اکسیدان‌ها بشمار می‌روند (Ferre et al., 2001). ترکیبات فنلی و آنتوسیانینی از مهمترین مواد موثره‌ی ثانویه در زرشک بعنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشند (Sun et al., 2002; al., 2008; Silic, 2005; Kremer et

Sasikumar و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند میوه‌ی زرشک توان آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و در جاروب کردن رادیکال‌های سوپراکسید، DPPH و نیتریک اکسید موثر است. محققان به بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اتانولی میوه‌های زرشک پرداختند و نشان دادند که این خاصیت به علت ترکیبات فنلی موجود در میوه‌ها است (Farag et al., 2003; Hanachi et al., 2009). خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی گیاه زرشک زرافشانی توسط مجد و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده است. Motalleb و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که عصاره‌ی میوه‌ی زرشک سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بوده و پوست ریشه‌ی آن سرشار از ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی است.

Poklarulrih و Pogačnik (۲۰۱۱) توان آنتی‌اکسیدانی ۸ نوع گیاه از جمله زرشک (*Berberis Vulgaris*) را مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که زرشک از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار است. برنجی اردستانی و همکاران (۲۰۱۳) خواص فیزیوشیمیایی و محتوای فنلی و آنتوسیانینی در دو گونه‌ی زرشک *Berberis Vulgaris* و *Berberis Integerrima* را مورد بررسی قرار دادند و

تعیین مقدار ترکیبات فلاونویدی

مقدار ترکیبات فلاونویدی با روش نورسنجی کلرید آلومینیوم تعیین شد (Chang *et al.*, 2002). به ۱ میلی‌لیتر عصاره گیاهی تر ۱ میلی‌لیتر محلول کلرید آلومینیوم در محلول متانول ۵٪ اسید استیک در متانول اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه واکنش جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۳۰ نانومتر در برابر نمونه شاهد خوانده شد. نتایج بصورت میلی‌گرم هم ارز کوئرستین بر گرم وزن تر گزارش شد.

سنجش ظرفیت مهار پراکسیداسیون چربی به روش تیوباربیتوریک اسید (TBA)

میزان پراکسیداسیون لیپید در بافت‌ها از طریق تعیین محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) در واکنش با تیوباربیتوریک اسید سنجیده می‌شود. به این منظور ۲ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ و ۲ میلی‌لیتر از محلول TBA ۰/۶۷٪ به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های نمونه‌های گیاهی اضافه شد این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰°C قرار گرفت و پس از سرد شدن تا دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فعالیت ضد اکسایشی بر اساس جذب محلول رویی در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است.

تعیین فعالیت گیرندگی رادیکال به روش DPPH

میزان گیرندگی رادیکال‌های پایدار DPPH با استفاده از روش Cuendent و همکاران (۱۹۹۷) تعیین شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از عصاره به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۰۴٪ DPPH اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. درصد گیرندگی عصاره‌ها طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$IC \% = (A \text{ blank} - A \text{ sample}) / A \text{ blank} \times 100 \quad (1)$$

در این فرمول Ablank جذب کنترل و Asample جذب نمونه می‌باشد و IC فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال بوده و بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و درصد مهارکنندگی است.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید

میزان مهار رادیکال‌های نیتريت با استفاده از واکنش Illosvoy Griss (Garrat, 1964) بدست آمد. محلولی متشکل از ۲ میلی‌لیتر سدیم نیتروپروسید (۱۰ میلی‌مولار) و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین با ۲۰ میکرولیتر عصاره مخلوط شد. محلول حاصله به مدت ۱۵۰

دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از انکوباسیون ۱ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش با ۱ میلی‌لیتر از عامل سولفانلیک اسید (۰/۳۳٪ در گلاسیال استیک اسید ۲۰٪) مخلوط شد و اجازه داده شد به مدت ۵ دقیقه، جهت تکمیل واکنش باقی بماند. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱٪ به محلول مذکور اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج ۵۴۰ نانومتر سنجیده شد. درصد جمع‌آوری رادیکال توسط معادله ذیل محاسبه شد.

$$(2) \quad A \text{ sample} \times 100 / (A \text{ blank} - A \text{ sample}) = \text{درصد جمع‌آوری رادیکال‌های نیتريت}$$

Asample: جذب همراه با نمونه

Ablank: جذب بدون نمونه

قدرت احیای آهن با استفاده از سنجش FRAP

قدرت احیای آهن با استفاده از سنجش FRAP با روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) با اندکی تغییر تعیین شد. معرف FRAP حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر از TPTZ ۱۰ میلی‌مولار در HCL ۴۰ میلی‌مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر FeCl₃ ۲۰ میلی‌مولار و ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات ۰/۳ مولار (pH=۳/۶) بطور تازه، تهیه شد. ۳ میکرولیتر از هر عصاره با ۳ میلی‌لیتر از معرف FRAP مخلوط و جذب واکنش در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

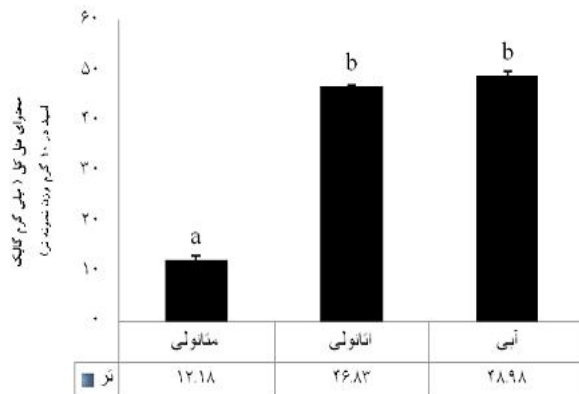
سنجش‌ها همه در سه تکرار انجام شدند و نتایج بصورت مقادیر میانگین و خطای استاندارد (SE) میانگین بیان شده‌اند. ارتباط داده‌ها با استفاده از واریانس تک سویه در سطح احتمال ۵٪ (p<0/05) آنالیز شدند. رسم جدول‌ها و نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و EXCEL انجام شد.

نتایج و بحث

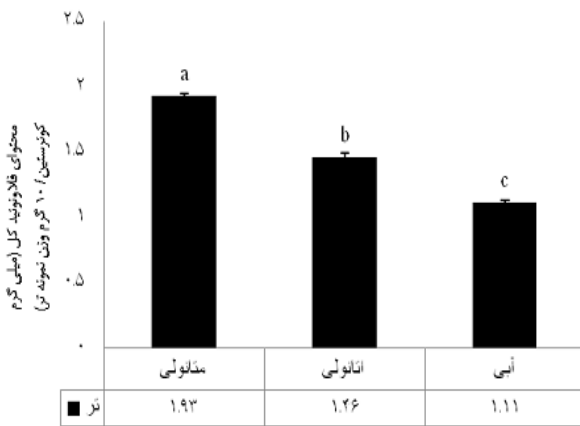
محتوای فنل و فلاونوئید

در فرآیند استخراج عواملی چون نوع حلال و زمان استخراج بسیار مهم هستند (Hayouni *et al.*, 2007). استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از مواد گیاهی به حلالیت این ترکیبات در حلال‌های مختلف بستگی دارد، به علاوه قطبیت حلال‌های مورد استفاده نقش کلیدی را در افزایش حلالیت این ترکیبات بازی می‌کند (Huang, 2003; Javanmardi *et al.*, 2005; *et al.*). حلال‌هایی با درجه قطبیت پائین نظیر هگزان، استون، بوتانول و کلروفرم نسبت به حلال‌های قطبی توانائی کمتری در استخراج این ترکیبات دارند (Rumbaoa *et al.*, 2009).

فلاونوئید احتمالات تحت تاثیر نوع و ترکیب فلاونوئید موجود در زرشک است که بیشتر در متانول حلالیت داشته اند.



شکل ۱ - محتوای فنل کل (برحسب میلی گرم گالیک اسید در ۱۰ گرم نمونه تر) در میوه تر زرشک *B.integerrima* × *vulgaris* عصاره‌گیری‌های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار ± SE, $p < 0.05$)



شکل ۲ - محتوای فلاونوئید کل (برحسب میلی گرم کوئرستین در ۱۰ گرم تر) در میوه تر زرشک *B.integerrima* × *vulgaris* عصاره‌گیری‌های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار ± SE, $p < 0.05$)

سنجش میزان مالون دی آلدئید

میزان اکسایش لیپیدها با تعیین میزان مالون دی آلدئید (MDA) انجام شد. تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث اکسایش اسیدهای چرب غیراشباع دارای چندین پیوند دوگانه در غشای پلاسمایی و ایجاد (MDA) می‌شود. نشان داده شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی برگ و میوه‌ی زرشک می‌تواند در پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و حفاظت در برابر آسیب DNA موثر باشد (Hanachi et al., 2006). اندازه‌گیری مهار پراکسیداسیون لیپیدها روش مناسبی برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان بشمار می‌رود. اکسید شدن اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء زیستی منجر به تشکیل رادیکال‌های چربی می‌شود. جذب اکسیژن توسط این

حلالیت ترکیب‌های فنلی با توجه به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آنها و برهمکنش آنها با سایر ترکیب‌های موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است (Trabelsi et al., 2010). استفاده از آب بعنوان حلال استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن برخی از ترکیبات فنلی با درجه قطبیت پائین به میزان کمتری استخراج می‌شوند. افزودن آب به حلال‌های آلی با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی همراه بوده و بنابراین از استخراج مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنلی در این شرایط اطمینان حاصل می‌گردد. علاوه بر این عصاره‌ی آبی حاوی مقادیر زیادی از ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول می‌باشد که می‌توانند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنلی تداخل ایجاد نمایند (Chirinos et al., 2007). نتایج آنالیز واریانس نشان داد نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج تاثیر معنی‌داری ($P < 0.05$) بر مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دارد. نمودار شماره ۱ مقدار ترکیبات فنلی تام را بر حسب میلی گرم هم ارز گالیک اسید بر گرم نشان می‌دهد. محتوای تام ترکیبات فنلی برای عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی به ترتیب ۴۸/۹۸ ± ۰/۴۹، ۴۶/۸۳ ± ۰/۴۸، ۱۲/۱۸ ± ۱/۵۶ میلی گرم گالیک اسید در ۱۰ گرم وزن تر زرشک بدست آمد. بیشترین میزان فنل تام مربوط به عصاره آبی بود. نمودار شماره ۲، مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را بر حسب میلی گرم کوئرستین نشان می‌دهد. محتوای فلاونوئید نیز، برای همین مجموعه به ترتیب ۱/۱۱ ± ۰/۲۷، ۱/۲۶ ± ۰/۱۱، ۱/۴۶ ± ۰/۳۳ میلی گرم کوئرستین در ۱۰ گرم زرشک تر بدست آمد.

بالاترین مقدار فلاونوئید در عصاره متانولی مشاهده شد. Özgen و همکاران (۲۰۱۲) محتوای فنلی برای ۶ گونه مختلف زرشک را بین ۱۱۷ ± ۲۵۶ تا ۲۴۰ ± ۳۶۲ mg.L⁻¹ محاسبه کردند.

برنجی اردستانی و همکاران (۲۰۱۳) میزان فنل در میوه *Berberis Vulgaris* را ۲۷/۹۹ g/100g گزارش کرده اند. محتوای فنلی کل در میوه زرشک تازه *Berberis Vulgaris* در ترکیه ۷۸۹/۳۲ ± ۸۸/۵۰ mg/100g گزارش شده است (Akbulut et al., 2009). میزان کل فنل بدست آمده در این تحقیق کمتر است و این ممکن است به دلیل مراحل رسیدن میوه‌ها و یا برخی از عوامل محیطی باشد (Özgen et al., 2008 ; Özgen et al., 2012).

در مطالعه Sasikumar و همکاران (۲۰۱۲) محتوای فلاونوئیدی ۳۲۰ mg معادل اکی والان کوئرستین در ۱۰۰ گرم میوه تازه زرشک گزارش شده است. Pyrkosz-Biardzka و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند عصاره‌ی متانولی *Berberis Vulgaris* حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها است. قاسمی و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که بالاترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به ترتیب در میوه و برگ زرشک وجود دارد. عصاره‌ی متانولی زرشک تر کمترین مقدار فنل تام را دارا بود اما احتمالاً متانول توانسته حلال خوبی برای فلاونوئیدهای موجود در زرشک باشد، یعنی بیشتر بودن

ترکیبات فنلی بالاتر در پوست، توانایی پوست در ممانعت از اکسیداسیون بالاتر از دانه می‌باشد. به عبارتی ترکیبات فنلی با پاکسازی رادیکال‌های آزاد از اکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری نموده و مانع افزایش مالون دی آلدئید می‌شوند، در بررسی حاضر نیز نتیجه‌ی مشابهی بدست آمد.

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH

نتایج آنالیز واریانس نشان داد نوع عصاره‌ها تاثیری معنی‌داری بر میزان رادیکال‌های آزاد داشتند ($P < 0.05$). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش رادیکال DPPH در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است. در این بررسی، درصد به دام‌اندازی رادیکال DPPH به ترتیب در عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی $0.66 \pm 0.34/88$ ، $0.60 \pm 0.41/60$ و $0.99 \pm 0.44/62$ مشخص شد. تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف در این بررسی را می‌توان به تفاوت در ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آنها نسبت داد. افزایش غلظت ترکیبات فنلی بطور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sanchez-Moreno et al., 1999). قدرت مهارکنندگی عصاره‌های مختلف به میزان زیادی به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنلی بستگی دارد. در ترکیبات فنلی با وزن مولکولی پائین‌تر گروه‌های هیدروکسیل راحت‌تر در دسترس قرار می‌گیرند (Jung et al., 2006).

در این بررسی عصاره‌ی متانولی نسبت به سایر عصاره‌ها فعالیت ضدرادیکالی بالاتری نشان داد. در مطالعه Pogačnik و Poklarulrih که در سال ۲۰۱۱ بر روی گیاه *Berberis Vulgaris* صورت گرفت نشان داده شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی گیاه نسبت به عصاره‌ی آبی آن بیشتر است که با نتیجه بدست آمده در این بررسی مطابقت داشت.

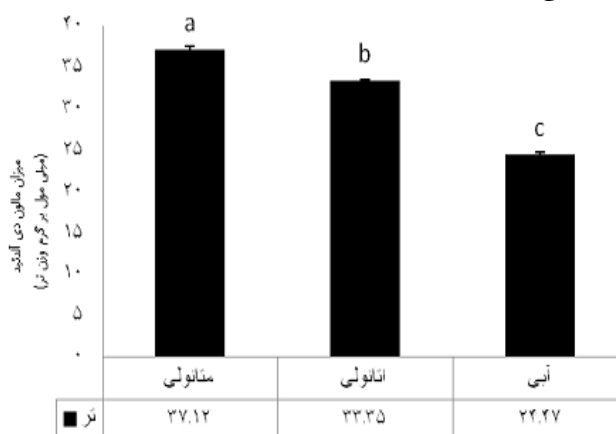
Sasikumar و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH عصاره متانولی زرشک *Berberis tinctoria* (*Berberis Lesch.*) بطور کارآمدتری از آنتی‌اکسیدان سنتزی بالاتر بود.

Pyrkosz-Biardzka و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی مقایسه‌ای سه گیاه *Cornus*، *Berberis vulgaris* و *Mahonia aquifolium* به این نتیجه رسیدند که فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال DPPH در عصاره‌ی متانولی گیاه *Berberis vulgaris* در مقایسه با دو گیاه دیگر بسیار بالاتر بوده‌است.

در بررسی El-Wahab و همکاران (۲۰۱۳) که بر روی عصاره‌ی

رادیکال‌ها موجب آرایش مجدد پیوندهای دو گانه در چربی‌های غیر اشباع شده که منجر به تخریب غشاء و تولید مالون دی آلدئید می‌شود که بعنوان یک ماده جهش‌زا و سرطان‌زا شناخته شده است. تشکیل هیدروکسیدها یک ماده‌ی واسطه در فرایند پراکسیداسیون چربی‌هاست. در واقع می‌توان از مالون دی آلدئید بعنوان شاخص پراکسیداسیون استفاده نمود. تاکنون در زمینه مهار پراکسیداسیون لیپید در عصاره‌های زرشک هیچگونه بررسی صورت نگرفته است.

رایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره‌های مختلف از نظر محتوای MDA با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند. میزان MDA به ترتیب در عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی $0.24/47 \pm 2/89$ ، $0.33/35 \pm 17/006$ و $0.37/12 \pm 0/79$ میلی‌مول بر گرم وزن تر به دست آمد. طبق نمودار شماره ۳ در بین عصاره‌های مذکور بیشترین میزان MDA در عصاره متانولی مشاهده شد. نتایج بدست آمده از ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف زرشک برحسب میزان MDA نشان می‌دهد که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره آبی است.



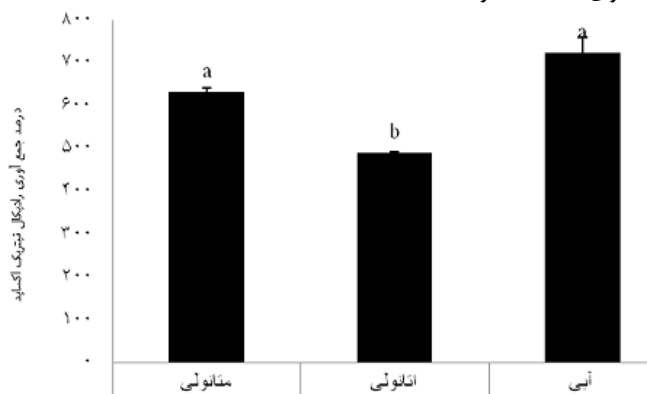
شکل ۳- مقدار مالون دی آلدئید اندازه‌گیری شده در میوه تر زرشک *B. integerrima* × *vulgaris* در عصاره‌گیری‌های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار ±SE، $p < 0.05$)

در بررسی El-Wahab و همکاران (۲۰۱۳) عصاره اتانولی یک مهارکننده قوی برای مهار پراکسیداسیون لیپیدی معرفی شد. این نتیجه قبلاً در مورد عصاره متانولی زرشک به اثبات رسیده بود (El-Sayed, 2011).

این اثر آنتی‌اکسیدانی را به محتوای فنلی عصاره‌ها نسبت می‌دهند. در واقع با افزایش غلظت، مقدار ترکیبات فنلی افزایش یافته که منجر به افزایش گروه‌های فعال برای مهار رادیکال آزاد می‌گردد. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را دارند. عماد (۲۰۰۶) با افزودن عصاره پوست و دانه انگور به روغن آفتابگردان گزارش کرده است که به دلیل وجود

فعالیت آنتی‌ادیکالی بر علیه رادیکال NO ممکن است توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره‌ی زرشک باشد که با اکسیژن بر سر واکنش با NO رقابت می‌کنند (Marcocci *et al.*, 1958).

El-Wahab و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که عصاره‌ی زرشک می‌تواند سطح رادیکال نیتریک اکساید را به میزان ۱۶ تا ۲۵ درصد کاهش دهد. Sasikumar و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی فعالیت پاک‌کنندگی عصاره‌ی متانولی زرشک پرداختند و نشان دادند که قدرت به دام‌اندازی عصاره متانولی زرشک در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT کمتر است.



شکل ۵- درصد جمع‌آوری رادیکال نیتریک در میوه تر زرشک *B. integririma*×*vulgaris* در عصاره‌گیری‌های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار ±SE، $p < 0.05$)

در گیاهان اکسید نیتريت از چهار مسیر تولید می‌شود:

۱- آرژینین سنتتاز وابسته به نیتریک اکسید سنتتاز

۲- توسط نیترات ردوکتاز متصل به غشا پلازما

۳- توسط زنجیره الکترون میتوکندری

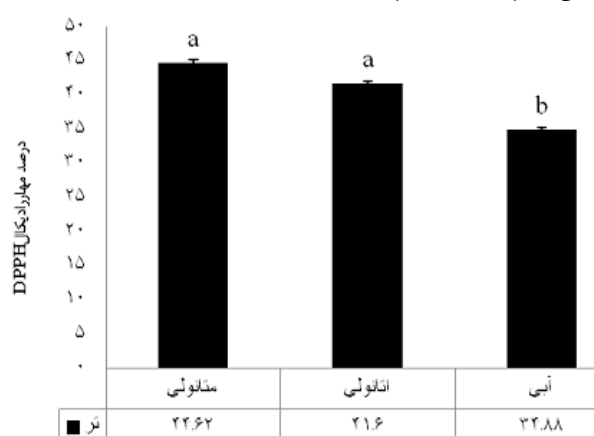
۴- توسط واکنش‌های غیر آنزیمی.

معمولا ترکیبات فنلی در رقابت با اکسیژن در واکنش سنتز رادیکال را مهار می‌کنند. علی‌الرغم این هر ماده دیگری که بتواند اکسیژن را در مسیر حذف کند می‌تواند در مهار این رادیکال نقش داشته باشد. بسیاری از آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدها هم می‌توانند در به تله انداختن اکسیژن نقش داشته باشند و مانع از ترکیب آن با نیتريت و تشکیل رادیکال‌های نیتريت شوند.

نیکخواه و همکاران (۱۳۸۸) نشان دادند عصاره‌های آنتوسیانینی توت‌ها بطور موثری توانایی مهار رادیکال نیتریک اکساید را دارند. ترکیبات فنلی و آنتوسیانینی از مهمترین مواد موثره ثانویه در زرشک بعنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشند (Sun *et al.*, 2002; Silic, 2005; Kremer *et al.*, 2008).

قاسمی و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که میوه‌ی زرشک سرشار از آنتوسیانین است، احتمالا آنتوسیانین موجود در زرشک در مهار

اتانولی زرشک انجام شد عصاره مذکور توانایی بالایی در مهار رادیکال DPPH نشان داد. قدرت مهار DPPH فقط تحت تاثیر فنل کل نیست احتمالا آنتی‌اکسیدان‌های دیگر مثل آنتوسیانین‌ها هم در این امر دخیل هستند. همانطور که مشخص شده ترکیبات فنلی و آنتوسیانینی از مهمترین مواد موثره ثانویه در زرشک بعنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشند (Sun *et al.*, 2002; Silic, 2005; Kremer, 2008). البته آنتی‌اکسیدان‌های دیگری نیز مثل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی (میزان ویتامین ث و یا توکوفرول) نیز می‌توانند در این امر موثر باشند همچنان که توکولی و همکاران (۱۳۹۲) قدرت آنتی‌اکسیدانی (قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH) بالای پوست گیاه کلخونگ را به مقدار فراوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن به ویژه ترکیبات توکوفرولی نسبت دادند. در بسیاری از مطالعات رابطه مستقیمی بین محتوای فنل، فلاونوئید و قدرت پاک‌کنندگی رادیکال DPPH وجود دارد (Biglari *et al.*, 2008; Brighente *et al.*, 2007). در این بررسی نیز نتایج فعالیت جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد در عصاره‌های مختلف گیاه زرشک با روش DPPH همبستگی مثبت معنی‌داری با محتوای فلاونوئیدی را نشان داد ($R^2 = 0.923$).



شکل ۴- درصد جمع‌آوری رادیکال DPPH، در میوه تر زرشک *B. integririma*×*vulgaris* در عصاره‌گیری‌های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار ±SE، $p < 0.05$)

سنجش به دام‌اندازی نیتریک اکساید

نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره‌های مختلف از نظر به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) با یکدیگر دارند. در شکل شماره ۵ قدرت به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره‌های مختلف زرشک نشان داده شده است. در این بررسی توانایی به دام‌اندازی برای عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی به ترتیب $۶۳۲/۳۸ \pm ۱۸/۵۹$ ، $۴۹۰/۶۷ \pm ۵/۳۹$ ، $۷۲۳/۶۰ \pm ۶۴/۵۶$ درصد بدست آمد. به عبارتی در بین عصاره‌های مختلف عصاره‌ی آبی توانایی بالاتری برای به دام انداختن رادیکال نیتریک اکساید داشت.

رادیکال نیتریک اکساید نقش موثری دارد.

بود.

Pyrkosz-Biardzka و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی مقایسه‌ای سه گیاه *Mahonia aquifolium* و *Cornus*، *Berberis vulgaris* نشان دادند که توان احیای آهن به روش FRAP در عصاره متانولی گیاه *Berberis vulgaris* در مقایسه با دو گیاه دیگر بسیار بالاتر بود. مقایسه نتایج سه روش آزمون سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد در هر دو روش ضد رادیکالی DPPH و قدرت احیا به روش FRAP عصاره‌ی متانولی و آبی به ترتیب دارای بیشترین و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است اما در گیرندگی رادیکال نیتریک اکساید عصاره‌های آبی و اتانولی بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند که خود نشان‌دهنده تفاوت ترکیب شیمیایی عصاره‌های مختلف می‌باشد. Kawagishi و همکاران (۱۹۸۸) بیان نمودند که برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی در الکل نسبت به آب محلول تر هستند. در این آزمایش هدف بررسی تبدیل Fe^{+2} به Fe^{+3} توسط عصاره‌های مختلف بوده است، مطالعات معمولاً نشان داده که در استخراج ترکیبات فنلی حلال‌های آلی مخصوصاً متانول، نسبت به آب موثرتر بوده و احتمالاً ترکیبات فنلی احیاکننده توسط عصاره‌ی متانولی بهتر استخراج شده‌اند.

نتیجه‌گیری

اگرچه جهت استخراج ترکیبات فنلی از حلال‌های مختلف می‌توان استفاده نمود اما بررسی نتایج مربوط به میزان فنل تام و گیرندگی رادیکال نیتریک اکساید نشان داد که بهترین حلال آب می‌باشد و از طرف دیگر بالاترین توان گیرندگی رادیکال DPPH، میزان فلاونوئید و توان احیاکنندگی مربوط به عصاره اتانولی می‌باشد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی با سه روش (مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، نیتریک اکساید و قدرت احیاکنندگی) اندازه‌گیری شد که در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و احیاکنندگی عصاره متانولی و در به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره آبی دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود.

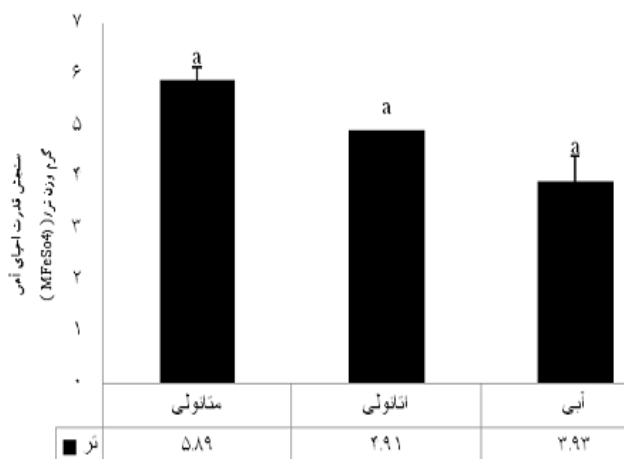
تفاوت در نتایج سه روش حکایت از تفاوت ترکیب‌های شیمیایی عصاره‌های مختلف داشت، در نهایت می‌توان بیان کرد که گیاه *Berberis integerrima*×*Vulgaris* به واسطه داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی توان آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد، و از این رو می‌تواند به‌عنوان منبعی غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، مورد پژوهش بیشتر قرار گیرد. با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان، مطالعات بیشتر در زمینه کاربرد این عصاره‌ها در سیستم‌های غذایی مستعد به اکسیداسیون پیشنهاد می‌گردد.

قدردانی

بدین وسیله از راهنمایی ارزشمند جناب آقای مهندس معروفی

قدرت احیای آهن با استفاده از سنجش FRAP

روش FRAP که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را بر اساس توانایی احیاکنندگی آهن می‌سنجد در حقیقت تخمین خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات قابل حل در آب را نشان می‌دهد (et al., Deepa 2007). شکل ۶ قدرت سنجش احیای آهن به روش FRAP در عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی زرشک را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره‌ها از نظر قدرت احیاءکنندگی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. میزان قدرت احیای آهن در عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی به ترتیب $۳/۹۳ \pm ۲/۴۰$ ، $۴/۹۱ \pm ۰/۴۲$ و $۵/۸۹ \pm ۰/۴۲$ میلی‌مول بر گرم وزن تر بدست آمد. میزان قدرت احیای آهن در عصاره متانولی نسبت به سایر عصاره‌ها بالاتر بود. اختلاف مشاهده شده بین عصاره‌ها از نظر قدرت احیاءکنندگی را می‌توان به تفاوت در نوع ترکیبات فنلی استخراج شده توسط هر یک از این حلال‌ها نسبت داد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی مختلف با توجه به ساختار شیمیایی آنها متفاوت است.



شکل ۶- قدرت احیای آهن با استفاده از سنجش FRAP در میوه تر زرشک *B. integerrima*×*vulgaris* در عصاره‌گیری‌های مختلف متانولی، اتانولی و آبی (سه تکرار \pm SE, $p < 0.05$)

ترکیبات فنلی مانند کاتچین در تعیین FRAP می‌توانند نقش داشته باشند همانطور که مشخص شده است زرشک سطح قابل توجهی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند کاتچین دارد (Mortazaeinezhad and Safavi 2011). در روش FRAP نیز نتیجه‌ای مشابه روش DPPH بدست آمد. بدین معنا که عصاره متانولی نسبت به سایر عصاره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از خود نشان داد. Özgen و همکاران (۲۰۱۲) دامنه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۶ گونه زرشک به روش FRAP را بین ۴۱ و $165.5 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$ گزارش کردند که این مقادیر بسیار بالاتر از بسیاری از میوه‌های قرمز تیره

عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی استان کردستان جهت
 علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان) جهت انجام آنالیزهای آماری
 شناسایی گونه گیاه مذکور و جناب آقای علی شهناز (عضو هیئت
 سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

- توکلی، ج، حداد خداپرست، م.ح، اسماعیل زاده کناری، ر، امین لاری، م. و شریف، ع، ۱۳۹۲، بررسی قدرت آنتی اکسیدانی روغن پوست کلخونگ به عنوان منبع غذایی جدید در ایران، نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۹(۱)، ۶۷-۶۱.
- مازندرانی، م، قاسمی، ن. و بیات، ه، ۱۳۹۲، بررسی مهمترین مواد موثره ثانوی و مقایسه آن در اندامهای مختلف گیاه در دارویی زرشک (*Berberis vulgaris* L.) در جنوب شرق استان گلستان، فصلنامه پژوهشهای علوم گیاهی، ۸، ۷۰-۵۹.
- نیکخواه، ا، خبامی، م. و حیدری، ر، ۱۳۸۸، بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال های نیتریک اکسید توسط عصاره آنتوسیانینی میوه های شاه توت (*Morus nigra* L.)، توت فرنگی (*Fragaria Vesca* L.) و توت سیاه (*Morus alba* L. Var. *Nigra*)، فصلنامه علمی -پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۱(۱) ۲۵، ۱۲۸-۱۲۰.
- Ahmadi, F., Kadivar, M & Shahedi, M., 2007, Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. *Food Chemistry*, 105: 57-64.
- Akbulut, M., Calisir, S., arakoglu, T. & Coklar, H., 2009, Some physicochemical and nutritional properties of *Berberis vulgaris* L. fruits. *Journal of Food Process Engineering*, 32: 479-511.
- Benzie, IF. & Strain, JJ., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. *Anal. Biochemistry*, 239: 70-76.
- Berenji Ardestani, S., Sahari, M. A., Barzegar, M. & Abbasi, S., 2013, Some physicochemical properties of Iranian native barberry fruits (abi and poloei): *Berberis integerrima* and *Berberis vulgaris*. *Journal of food and Pharmaceutical Sciences*, 1: 67-74.
- Biglari, F., Alkarkhi, A.F.M. & Easa, A.M., 2008, Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107: 1636-1641.
- Brighente, I.M.C., Dias, M., Verdi, L.G. & Pizzolatti, M.G., 2007, Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*. 45: 156 - 161.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C., 2002, Estimation of total flavonoid Content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Anal*, 10: 178-182.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. & Larondelle, Y., 2007, Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon). *Separation and Purification Technology*, 55: 217-225.
- Cuendert, M., Hostettmann, K. & Potterat, o., 1997, Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80: 1144-1152.
- Deepa, N., Kaura, Ch., Georgea, B., Singhb, B. & Kapoor, H.C., 2007, Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annum* L.) genotyps during maturity. *LWT Food Science and Technology*, 40: 121-129.
- Doggrell, S.A., 2005, Berberine-a novel approach to cholesterol lowering. *Expert Opinion Investing Drugs*, 14(5): 683-685.
- El-Sayed, M., Ghareeb, DA., Sarhan, EM. & Khalil, AA., 2011, Therapeutic Bio-screening of the bioactive extracted ingredients of *Berberis vulgaris*, *berberine*. *FPSB*, 13: 63-68.
- El-Wahab, AEA., Ghareeb, DA., Sarhan, EEM, Abu-Serie, M.M. & Demellawy, MAEI, 2013, In vitro biological assessment of berberis vulgaris and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *Academic Journal*, 5(13): 218.
- Emad, S, 2006, Antioxidant effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. *LWT Food Science and Technology*, 39: 883-892.
- Farag, RS., El-Baroty, GS. & Basuny, AM, 2003, The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cv. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(1): 81-87.
- Fatehi, M., Saleh, T.M. & Fatehi-Hassanabad, Z., 2005, A pharmacological study on *Berberis Vulgaris* fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(10): 46-52.
- Ferre, N., Camps, K., Cabre, M., Paul, A. & Joven, J., 2001, Hepatic paraoxygenase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism*, 50(9): 997-1000
- Garrat, D.C., 1964, The quantitative analysis of drugs, vol.3. Chapman and Hall 1th. *Japan*, 456-458.

- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E. & Offen, D., 2001, Oxidative stress induced neuro-degenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8):959-75.
- Hanachi, P. and Golkho, Sh., 2009, Using Hplc to determination the composition and antioxidant activity of *Berberis vulgaris*. *Europian Journals Publishing*, 29: 47-54.
- Hanachi, P., Kua, S.H., Asmah, R., Motalleb, G. and Fauziah, O., 2006, Cytotoxic effect of *Berberis vulgaris* fruit extract on the proliferation of human liver cancer cell line (HepG2) and its antioxidant properties. *Int. J. Cancer Res*, 2: 1-9.
- Hayouni, A., Abedrabba, M., Bouix, M. & Hamdi, M., 2007, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105 (3):1126–1134.
- Huang, D., Ou B. & Prior, R. L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841–1856.
- Hou, WC., Lin, RD., Cheng, KT., Hung, YT., Cho, CH., Chen, CH., Hwang, SY. & Lee, MH., 2003, Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine*, 10: 170-175.
- Ielpo, M.T.L., Basile, A., Miranda, R., Moscatiello, V., Nappo, C., Sorbo, S., Laghi, E., Ricciardi, M.M., Ricciardi, L. & Vuotto, M.L., 2000, *Immunopharmacological properties of flavonoids Fitoterapia*, 71: 101-109.
- Ivanovska, N. & Phlipov, S., 1999, Study on the anti-inflammatory action of *berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloid. *International Journal Ethnopharmacology*, 64 (2):161-166.
- Javanmardi, L., Stushnoff, C., Locke, E. & Vivanco, J. M., 2003, Antioxidant activity and total phenolic contents of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83:547–550.
- Jung, CH., Seog, HM., Choi, IW., Park, MW. & Cho, HY., 2006, Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT*, 39: 266-274.
- Kahl, R. & Kappus, H., 1993, Toxicity of synthetic antioxidants BHT and BHA in comparison with natural antioxidants vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 196: 329–338.
- Kawagishi, H A., Nomura, T., Yumen, T., Mizumo, T., Hgwara, A. & Nakamuna, T., 1988, Isolation and Properties of Lecitin from The Fruiting Bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydrate Research*, 15183(1):150-154.
- Kremer, D., Randic, M., Kosalec, I. & Karlovic, K., 2008, New localities of *Berberis croatica* Horvat in Croatia. *Acta Botanica Croatica*, 67: 237–244.
- Kuliscic, T., Radonic, A. & Katalinic, V., 2004, Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. *Journal of Food Chemistry*, 85: 633-640.
- Kumaran, A. & Karunakaran, R.J., 2006, Antioxidant and free radical scavenging activity an Aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97: 109-114.
- Majd, A., Mehrabian, S., Mostafai, H. & Rahmani, H., 2008, Antioxidant and anticancer effect of aqueous extract of *berberis integerrima*. *Journal of biological sciences*, 1: 31-38. [Article in Persian]
- Marcocci, L., Packe, L., Droy-Lefaiz, M. T., Sekaki, A. & Gardes-Albert, M., 1958, Antioxidant actions of *Ginkgo biloba* extract. *Methods of Enzymology*, 26: 1199-1202.
- Martynov, E.G., Stroeve, E.A. & Peskov, D.D., 1984, Polysaccharides of *Berberis vulgaris*. *Chemistry of Natural Compounds*, 20(1): 99-100.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K. & Stadtman, E.R., 2001, Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73: 73-84.
- Mensor, LL., Menezes, FS., Leitao, GG., Reis, AS., dos Santos, TC., Coube, CS. & Leitao, SG., 2001, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res*, 15:127-130.
- Mortazaeezahad, F. and Safavi, K., 2011, Investigation of epicatechin in barberry fruits. *International Conference on Life Science and Technology*, 3: 156-158.
- Motalleb, G., Hanachi, P., Kua, SH., Fauziah, O. and Asmah, R., 2005, Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. *Journal of Biological Science*, 5 (5): 648-653.
- Namiki, M., 1990, Antioxidants, antimutagens in food. *Critical Rev. Food Science & Nutrition*, 6: 273-300.
- Özgen, M., Wyzgoski, F.J., Tulio, A.Z., Gazula, A., Miller, A.R., Scheerens, J.C., Reese, R.N. & Wright, S.R., 2008, Antioxidant capacity and phenolic antioxidants of Midwestern black raspberries grown for direct markets are influenced by production site. *Hortscience*, 43:2039-2047.
- Özgen, S., Sekerci, Korkut, S.R. & Karabiyik, T., 2012, The tomoato debate: Postharvest- ripened or vine ripe has more antioxidant? *Hort. Environ. Biotechnology*, 53: 271-276.
- Pandjaitan, N., Howard, L.R., Morelock, T & Gil, M.I., 2005, Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by Genetics and maturation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8618-8623.
- Pogačnik, L. & Poklarulrih, N., 2011, Determination of antioxidants in medicinal herbs. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov Series VI: Medical Sciences*, 4 (53): 95-102.

- Pyrkosz-Biardzka, K., Z. Kucharska, A., Sokół-Łętowska, A., Strugała, P. and Gabrielska, J., 2014, A Comprehensive Study on Antioxidant Properties of Crude Extracts from Fruits of *Berberis vulgaris* L., *Cornus mas* L. and *Mahonia aquifolium* Nutt. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(2): 91-99.
- Rumbaoa, RGO., Cornago, DF. & Geronimo, IM., 2009, Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 546-550.
- Sabir, M., Akhter, M.H. & Bhide, N.K., 1978, further studies on pharmacology of berberin *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 22 (1): 9-13.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. & Saura-Calixto, F., 1999, Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32: 407- 412.
- Sasikumar, J. M., Maheshu, V., Smilin, A. G., Gincy, M. M. & Joji, C., 2012, Antioxidant and antihemolytic activities of common Nilgiri barberry (*Berberis tinctoria* Lesch.) from south India. *International Food Research Journal*, 19 (4): 1601-1607.
- Shahidi, F., 2000, Antioxidants in food and food antioxidants. *Molecular Nutrition & Food Reserch*, 44: 158-163.
- Shui, G. & Leong, L.P., 2002, Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 977: 89-96.
- Šilic, C., 2005, Atlas of dendroflora (trees and shrub) of Bosnia and Herzegovina. *Matica hrvatska C`itluk, Franjevac`ka kuc`a Masna Luka, C`itluk (in Bosnian)*, 18(2): 160-161.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X. & Liu, R.H., 2002, Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7449-7454.
- Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y. & Tsuji, K., 2002, An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 49: 507- 511.
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H. & Abdelly, C., 2010, Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4): 632-639.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M., 2006, Free radicals, metals. and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160:1-40.
- Yin, I., Hu, R., Chen, M., Tang, J., Li, F. & Yang, Y., 2002, Effects of berberine on glucose metabolism in vitro. *Metabolism*, 51(11): 1439-1443.

Comparison of anti-oxidative properties of fresh *Berberis* (*integerrima* × *Vulgaris*) in Aqueous and alcoholic solvents

F. Sharifi¹, L. Pourakbar^{*2}

Received: 2014.09.21

Accepted: 2015.06.04

Introduction: Numerous biochemical reactions in human body produce active oxygen which is able to destroy biomolecules. This destructive effect of free radicals can be blocked by antiradicals. The role of free radicals in causing a noticeable number of disease has been proved. Anti-oxidants defend against these oxidative destructions. One of the best natural resources of oxidants are phenolic compounds in plants. Phenolic compounds by giving electrons to free radicals, restrain lipid oxidative reactions. Chemical antioxidants have been using a lot in food industry such as BHT, BMA, TBHQ and propyl gallate that their destructive and carcinogenesis effects on human body have been proved. Therefore, nowadays, the consumption of medicinal plants and their phenolic compounds as natural resources of antioxidants has been highly recommended. Different solvents and a variety of extraction methods can be used for extracting anti-oxidative compounds from plant tissues. Polarization degree of different solvents will effect on the amount of extracted phenolic compounds. *Berberidaceae* family has a significant use in medicine and industry. There are biological activities in Barberry and it's highly used in food and medical industries. The main alkaloid of barberry is Berberine which has the anti-oxidative and anti-inflammatory properties and decreases blood pressure, hypoglycemia and lipid. Phenolic compounds and anthocyanins are the most important secondary active nutrients in Barberry. Barberry's extract and its bark root are rich in anti-oxidative and phenolic compounds. *Berberis Integerrima* × *vulgaris* has been studied in this research. The aim of this study was to determine the best solvent for extraction, the amount of phenolic compounds, anti-radical activity and anti-oxidative capacity in different extracts of fresh barberry which is gathered from Qamchoqai zone, Bijar, kordestan province.

Materials and method: For this study, Barberries were collected from Qamchoqai zone located in Bijar, Kurdistan, Iran. They had been maintained in freezer till we started to examine them. Then, we prepared the ethanol, methanol and water extracts of these frozen Berberis. The total Phenol and Flavonoid contents of extracts according to the method of UV-VIS, Total antioxidant activity content of extracts by using three different methods including scavenging activity of DPPH, NO, reducing power assay and the capacity of inhibit lipid peroxidation by thiobarbituric acid were determined.

Results and Discussion: In conclusion, this investigation demonstrates that Barberry is a rich source of phenolic compounds and antioxidant capacity. The aqueous extract showed the highest total phenol content (48/98±0/49 mg/g (wet weight)) and scavenging power of Nitric Oxide radical activity (%723/6±64/56) and the methanol extract showed the highest flavonoid content (1/93±0/033 mg/g(wet weight)), DPPH scavenging effect (%44/62±0/99), reducing power (5/89±0/42 mmol/g(wet weight)) and MDA content (37/12±0/79 mmol/g(wet weight)). The type of solvent used for extraction has significant effect on phenolic compounds and flavonoids. Methanol extract has the minimum amount of phenol in fresh barberry, but methanol is a good solvent for flavonoids in barberry. The result of anti-oxidative effects in different extracts of barberry according to MDA scale shows that the water extract has the maximum amount of anti-oxidative activity. These activities in extracts are because of the existence of phenols which prevent lipid oxidation by removing free radicals and stop the increase of Malondialdehyde. In this study, Methanol extract has the maximum amount of anti-radical activity. These different results in extracts are due to the different phenolic compounds and flavonoids in them. Among extracts, water extract has the maximum capacity in trapping nitric oxide radical. Anti-radical activity against NO radicals probably is done by anti-oxidative compounds in barberry which competes with O₂ over NO. In term of reduce power, extracts didn't have significant difference with each other. FRAP and DPPH method was the same result. This means that the methanol extract than other extracts showed higher antioxidant activity. In the extraction of phenolic compounds, Organic solvents especially methanol, was more effective than water and possibly "phenolic compounds derived regenerative better by methanol extract. Results showed that aqueous and alcohol extracts of *Berberis Integerrima* × *Vulgaris* can act as a natural antioxidant and after complimentary

1 And 2- M.S student and Assistant professor, Department of biology, Urmia University, Urmia, Iran.
(*-Corresponding Author Email: lpourakbar@yahoo.com)

experiments, it can be used in food and medicine industry

Keywords: Barberry, phenols, flavonoids, antioxidant activity, anti-oxidation properties

مدل‌سازی رهایش ترکیبات موثره‌ی نانوریزپوشانی شده‌ی زعفران از فاز داخلی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب

افشین فریدی اسفنجانی^۱، سید مهدی جعفری^{۲*}، الهام اسدپور^۳، حبیب‌الله میرزایی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۶

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی سینتیک رهایش پیکروکروسین، کروسین و سافرانال نانوریزپوشانی شده در فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب (W/O/W) به فاز آبی بیرونی آن بود. ترکیبات موثره‌ی زعفران به روش غرقابی استخراج و وارد امولسیون دوگانه گردیدند. برای این منظور، ابتدا میکروامولسیون عصاره‌ی زعفران در روغن به روش میکروامولسیون تشکیل و سپس این سامانه در فاز آبی شامل پروتئین آب پنیر و مالتودکسترین به صورت تک لایه و پروتئین آب پنیر-پکتین و مالتودکسترین به صورت دولایه دوباره امولسیونه شد. به منظور بررسی سینتیک رهایش ترکیبات موثره‌ی زعفران به فاز آبی بیرونی امولسیون دوگانه، ابتدا مدل‌های تجربی درجه صفر، درجه اول، هیگچی و هیکسون-کراول در نظر گرفته شدند. با بررسی داده‌های آزمایشگاهی مشاهده شد که امولسیون دوگانه پایدار شده با کنسانتره پروتئین آب پنیر و پکتین دارای بیش‌ترین گرانروی و کم‌ترین درصد رهایش پیکروکروسین، کروسین و سافرانال در طی ۲۲ روز نگهداری بود. در مورد رهایش کروسین، بهترین مدل مربوط به مدل مرتبه اول و در مورد رهایش پیکروکروسین و سافرانال بهترین مدل مربوط به مدل مرتبه صفر بود. مبنای مقایسه مدل‌های بررسی شده، ضریب برازش (R^2)، مربعات خطا (SSE) و ریشه میانگین مربعات خطا (RMSE) بود.

واژه‌های کلیدی: امولسیون دوگانه، رهایش، نانوریزپوشانی، عصاره‌ی زعفران

همسان^۵ رهایش نسبت داده می‌شود و بنظر می‌رسد که این خاصیت کروسین به دلیل بخش قندی آن باشد (Zeng ; Chen *et al*, 2008)؛ (Moraga *et al*, 2004; *et al*, 2003).

مقدمه

حفاظت و کنترل رهایش ترکیبات فعال همچون کروسین، پیکروکروسین و سافرانال منجر به افزایش کارایی آن‌ها می‌گردد. ریزپوشانی^۶ ترکیبات فعال غذایی و دارویی محلول در آب از کاربردهای مهم امولسیون دوگانه آب در روغن در آب می‌باشد که منجر به حفاظت و کنترل رهایش ترکیبات ریزپوشانی شده در شرایط محیطی مختلف می‌شود (Sapei *et al*, 2012). امولسیون دوگانه آب در روغن در آب شامل قطرات کوچک آب پخش شده در داخل قطرات روغن می‌باشد که خود این قطرات نیز بعنوان فاز پراکنده در فاز آبی پیوسته بیرونی قرار می‌گیرند. این سامانه‌ها (آب در روغن در آب) شامل سه فاز می‌باشد: دو فاز آبی (فاز آبی داخلی و خارجی که از لحاظ محتوا از هم متفاوت می‌باشند) و یک فاز روغنی که در بین آنها قرار گرفته است و به وسیله امولسیفایرهای آب‌دوست و آب‌گریز از دو فاز جدا شده است. پس برای تهیه امولسیون دوگانه آب در روغن در آب، ابتدا امولسیون آب در روغن به وسیله امولسیفایر آب‌گریز پایدار

زعفران به علت طعم و رنگ عالی کاربردهای فراوانی در تولید فراورده‌های غذایی، دارویی و شیمیایی دارد و با توجه به محدودیت کشت و تولید، از فراورده‌های گران‌قیمت به‌شمار می‌رود. زعفران همچنین در درمان برخی سرطان‌ها، بیماری‌های مغزی-عروقی و قلبی-عروقی، اسهال، سرخک، عفونت‌های دستگاه تناسلی، آسم و اختلالات دستگاه گوارش کاربرد دارد. این ادویه دارای خواص آرام‌بخشی، ضدتوموری، ضدکم‌خونی، ضدتخریب DNA، ضدافسردگی، ضددیابت و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بخش اعظمی از خاصیت درمانی زعفران به کروسین و

۱ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲ و ۴- دانشجویان، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* - نویسنده مسئول: (Email: smjafari@gau.ac.ir)

می‌توانند مورد بحث قرار گیرند:

۱- انتشار گونه‌های هیدروفیل به داخل روغن

۲- نفوذ از لایه نازک مایع غشا

۳- حل شدن مواد ریزپوشانی شده در میسل‌های معکوس و انتشار میسل‌ها به داخل روغن (Magdassi, 1986; Pays, 2002).

مدل‌سازی ریاضی رهایش ترکیبات فعال، بینش‌های مربوط به انتقال جرم و فرایندهای شیمیایی شامل در انتقال ترکیبات فعال را فراهم می‌کند و اثر پارامترهای دستگاهی همچون شکل و میزان ترکیبات فعال بارگذاری شده را بر رهایش داروها نشان می‌دهد.

بنابراین با استفاده از پیش‌بینی یک رویکرد سیستماتیک با حداقل داده‌های تجربی، می‌توان سامانه بهینه برای پروفایل رهایش ترکیبات دارویی و غذا داروها را طراحی نمود. مطالعات متعددی در زمینه سینتیک رهایش ترکیبات غذایی از حامل‌های آن‌ها صورت گرفته است. Fathi و همکاران (۲۰۱۳) رهایش هسپارین را از نانوحامل‌های لیپیدی در شرایط دستگاه گوارش انسان بررسی نمودند. آن‌ها مدل پیاس را بعنوان بهترین مدل برای بررسی سینتیک رهایش هسپارین معرفی نمودند Alvarado و همکاران (۲۰۰۹) آهن را وارد فاز آلی داخلی امولسیون دوگانه (W/O/W) پایدار شده با ترکیب پروتئین- پلی‌ساکارید نموده و سینتیک رهایش آن را از فاز آبی داخلی با مدل‌های هیگوجی، پیاس، هیکسون-کراول، درجه اول و درجه صفر بررسی نمودند.

مطالعه‌ای در زمینه رهایش ترکیبات موثره زعفران از حامل‌های آن‌ها صورت نگرفته است، در این مطالعه سینتیک رهایش کروسین، پیکرو کروسین و سافرانال نانوریزپوشانی شده از فاز داخلی به فاز بیرونی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب بررسی شد و امولسیون دوگانه مناسب برای حفاظت و کنترل رهایش ترکیبات موثره زعفران (کروسین، پیکروکروسین و سافرانال) بررسی گردید.

مواد و روش

مواد

زعفران از مزارع تربت حیدریه، خراسان رضوی تهیه گردید. کنسالتره پروتئین آب پنیر (پروتئین بالای ۸۰٪) از شرکت Sapotocheese- آمریکا، پلی‌گلیسرول پلی‌ریسنولات از شرکت Danisco- دانمارک، سوربیتان مونوالات از شرکت Merck- آلمان، پکتین مرکبات (GA: >65%, DE: 71.1%) از شرکت MP biomedical- هلند و مالتو دکسترین (DE 16-20) از شرکت Qinhuangdao starch Co- چین، روغن آفتابگردان از شرکت FRICO- سیرجان، ایران تهیه شدند. سدیم آزاید از شرکت سیگما آلدیج خریداری شد.

شده سپس این امولسیون در فاز آبی شامل امولسیفایر آب‌دوست پراکنده می‌گردد (Lobato-Calleros, 2006; Raynal, 1993).

از عوامل مهمی که می‌توانند بر افزایش توانایی امولسیون (W/O/W) برای حفاظت از ترکیبات ریزپوشانی شده اثر بگذارند می‌توان به استفاده از امولسیفایر مناسب اشاره نمود (Jager-lazer *et al*, 1997; chu *et al*, 2007). زیست بسپارهایی مانند پروتئین‌ها یک مثال خوب از امولسیفایرهای طبیعی می‌باشند که می‌توانند در صنعت غذا و امولسیون‌های دارویی مورد استفاده قرار گیرند. پروتئین‌ها به دلیل خاصیت جذب در سطح امولسیون روغن در آب باعث افزایش پایداری امولسیون‌ها می‌شوند. اغلب پلی‌ساکاریدها با ایجاد شبکه در فاز پیوسته به عنوان پایدارکننده^۱ عمل می‌کنند و باعث افزایش گرانروی فاز پیوسته می‌شوند (Dickinson, 2011).

ترکیب پروتئین- پلی‌ساکارید در شرایط مناسب (غلظت، نسبت پروتئین و پلی‌ساکارید، pH، نیروی یونی و دما) ممکن است باعث افزایش پایداری امولسیون‌ها شوند. در حقیقت ترکیب پروتئین و پلی‌ساکارید بصورت کووالانسی و یا الکترواستاتیکی انجام می‌گیرد.

علاوه بر این استفاده از زیست بسپارهایی همچون مالتو دکسترین می‌تواند با افزایش گرانروی فاز پراکنده امولسیون، برخورد قطرات با یکدیگر را کاهش داده و در نتیجه پایداری امولسیون را افزایش دهد (Boyer *et al*, 2012).

Lutz و همکاران (۲۰۰۹) از ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین برای پایداری امولسیون دوگانه آب در روغن در آب استفاده نمودند و نشان دادند که امولسیون پایدار شده با پروتئین آب پنیر دارای پایداری کم و رهایش بیشتر در مقایسه با امولسیون پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین می‌باشد. Girux و همکاران (۲۰۱۳) از ویتامین B₁₂ ریزپوشانی شده در امولسیون دوگانه در فرمولاسیون پنیر استفاده نمودند و نشان دادند که ریزپوشانی ویتامین B₁₂ با امولسیون دوگانه باعث حفظ و کنترل رهایش آن در فرآیند تولید پنیر و شرایط معده می‌گردد.

رهایش^۲ ترکیبات فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی از مشکلات اصلی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب می‌باشد. در امولسیون دوگانه آب در روغن در آب، دو نوع رهایش کلی وجود دارد: رهایش از طریق درهم آمیختگی بین قطرات فاز آبی داخلی و گلبول‌های سطحی برای مثال پارگی غشای بین فاز آبی داخلی و گلبول سطحی. علاوه بر این، انواع مواد محلول به دام افتاده در فاز آبی داخلی بدون پارگی غشا و از طریق انتشار (به دلیل نیروی محرکه حاصله از تفاوت در غلظت و فشار لاپلاس قطرات) از فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی رهایش می‌یابند. همچنین، انواع مختلفی از مکانیسم‌های انتشار

1 Stabilizer

2 Release

استخراج عصاره زعفران

برای استخراج عصاره زعفران از روش Kumpati و همکاران (۲۰۰۳) گردید. ابتدا ۱۰ گرم زعفران ساییده شده با هاون چینی به بطری تیره رنگ حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور شیکر دار (مدل کاوش مگا، ساخت کشور ایران) قرار داده شد. سپس بمنظور حداکثر میزان استخراج از همگن‌ساز (به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، مدل Heidolph ساخت کشور آلمان) استفاده شد. محلول بدست آمده تحت خلا صاف گردید و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جذب و مقدار ترکیبات موثره عصاره زعفران طبق استاندارد (ISO/TS 3632, 2003)، میزان پیکروکروسین (حداقل تلخی محلول ۱ درصد در طول موج ۲۵۷ نانومتر بر اساس ماده‌ی خشک): ۱۵۰/۶، سافرانال (مقدار محلول ۱ درصد در طول موج ۳۳۰ نانومتر بر اساس ماده‌ی خشک): ۸۱/۵۳، کروسین (حداقل قدرت رنگی محلول ۱ درصد در طول موج ۴۴۰ نانومتر بر اساس ماده‌ی خشک): ۲۴۳/۸۳ بود.

آماده‌سازی محلول بیوپلیمرها

برای تهیه محلول مالتودکسترین و پکتین، پودر آنها بطور جداگانه در آب حل و به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد (در دستگاه مگنت استایرر با دور ۵۰۰ rpm، مدل IKA ساخت کشور آلمان) و سپس جهت حل شدن کامل، این محلول‌ها به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شدند. در مورد محلول پروتئین آب پنیر، بعد از حل شدن پودر این پروتئین در آب، محلول بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله خنک گردید و یک شب در دمای یخچال بمنظور حل شدن کامل، نگهداری شد. همچنین برای جلوگیری از فساد میکروبی به محلول‌ها ۰/۰۰۱ درصد سدیم آزیاید اضافه گردید. لازم به ذکر است که pH تمامی محلول‌ها با استفاده از بافر فسفات بر روی ۶ تنظیم گردید. بعد از انجام پیش آزمون و سنجش درصد مختلف ترکیبات، طبق جدول ۲، محلول ترکیبی نهایی شامل: ۲۵٪ مالتودکسترین، ۸٪ پروتئین آب پنیر و ۲ درصد پکتین بود.

تهیه امولسیون دوگانه

امولسیون دوگانه آب در روغن در آب در دو مرحله بصورت زیر تهیه شد (Raynal, 1993):

الف - تولید امولسیون اولیه عصاره زعفران در روغن (W/O): ابتدا مخلوط‌های مختلفی از روغن آفتابگردان و سوربیتان مونوولئات تهیه و سپس عصاره زعفران را به این مخلوط‌ها به آرامی (قطره قطره) و در حالی که سامانه (مخلوط روغن و سوربیتان مونو اولئات) روی دستگاه هم‌زن و با دور ۳۰۰ دور در دقیقه قرار داشت، اضافه

گردید. اضافه نمودن عصاره زعفران تا جایی ادامه یافت تا سامانه غیرشفاف گردد و به محض غیر شفاف شدن، اضافه نمودن عصاره قطع و میزان عصاره اضافه شده یادداشت شد. این مراحل برای تمامی سامانه‌ها (درصد‌های مختلف روغن و سوربیتان مونوولئات) انجام گرفت. در انتها و با سنجش ویژگی (شاخص) شفافیت سامانه و میزان عصاره اضافه شده بهترین سامانه با این ترکیب‌ها مشخص شد: ۵٪ عصاره زعفران، ۶۲٪ روغن آفتابگردان، ۳۳٪ امولسیفایر سوربیتان مونوولئات و ۱۰٪ عصاره زعفران، ۶۰٪ روغن آفتابگردان، ۳۰٪ امولسیفایر سوربیتان مونوولئات. در واقع، غیر شفاف شدن سامانه نشان دهنده‌ی این است که اندازه قطرات امولسیون عصاره زعفران در روغن بیش از ۱۰۰ نانومتر می‌باشد که باعث ناپایداری می‌شود (Sadeghi et al, 2014).

ب - در مرحله دوم تولید امولسیون آب در روغن در آب، امولسیون اولیه (عصاره زعفران در روغن) به آرامی به محلول آبی دارای پروتئین آب پنیر ۸٪، مالتودکسترین ۲۵٪ و پکتین ۰/۲٪ اضافه شده و در دو مرحله همگن‌سازی انجام شد. ابتدا، همگن نمودن با اولتراتوکس (۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، مدل Heidolph ساخت کشور آلمان) و سپس همگن‌سازی دوباره برای تولید امولسیون نهایی بود (۸ دقیقه و ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، مدل Heidolph ساخت کشور آلمان).

بررسی خصوصیات امولسیون آب در روغن در آب

بررسی رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال

رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال از فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی امولسیون دوگانه به مدت ۲۲ روز و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شدند. برای این منظور، امولسیون‌ها پس از تولید در داخل ظروف شیشه‌ای ریخته و راندمان ریزپوشانی آن‌ها در روز اول و روز ۲۲ نگهداری اندازه‌گیری شد. میزان اختلاف راندمان ریزپوشانی روز اول و روز ۲۲ نگهداری، بیانگر میزان رهایش بود. راندمان ریزپوشانی و رهایش ترکیبات نانوریزپوشانی شده در امولسیون آب در روغن در آب با روش Regan and Mulvihill (۲۰۰۹) تعیین شدند. بدین صورت که ۳ گرم از امولسیون دوگانه با ۳ گرم از بافر فسفات (pH=7) مخلوط شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق با دور ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (مدل scientific centrifuge ساخت کشور امریکا) شد. سپس فاز پایینی به دقت جمع‌آوری شده و جذب کروسین، سافرانال و پیکروکروسین به ترتیب در طول موج ۴۴۰، ۳۳۰ و ۲۵۷ نانومتر خوانده شد و طبق استاندارد (ISO/TS 3632, 2003) درصد این ترکیبات در فاز پایینی تعیین شدند. با استفاده از فرمول زیر درصد ریزپوشانی و میزان رهایش ترکیبات نانوریزپوشانی شده را مشخص کردیم:

$$E (\%) = 100 - (C_2 \times 100 / C_1) \quad (1)$$

که در آن، C_2 درصد ترکیبات انکپسوله شده (کروسین،

برای بررسی سینتیک رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال از فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه (W/O/W) طبق جدول شماره ۱ از مدل‌های مرتبه صفر، مرتبه اول، هیگوجی و هیگسون-کراول استفاده شد.

جدول ۱- مدل‌های مورد استفاده

نام مدل	مدل	مرجع
مرتبه صفر	$Q_t \times t = Q_0 + K_0$	Siepmann <i>et al</i> , 2008
مرتبه اول	$Q = [1 - \exp(-kt)] \times 100$	Siepmann <i>et al</i> , 2008
هیگوجی	$Q_t = K_t \times t^{1/2}$	Siepmann <i>et al</i> , 2008
هیگسون-کراول	$(1 - (Q_t/Q_0))^{1/3} = -K_{HC}t + 1$	Siepmann <i>et al</i> , 2008

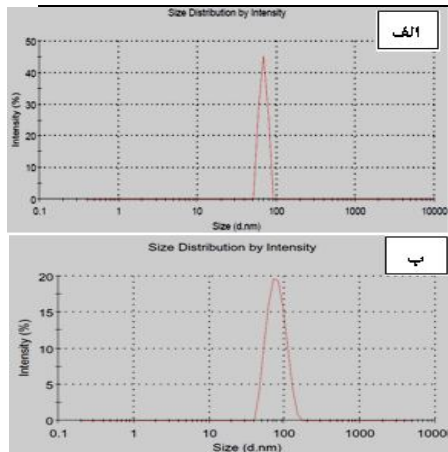
K ضریب مدل، t مدت زمان، Q_t درصد ترکیبات ریزپوشانی شده در فاز آبی بیرونی امولسیون آب در روغن در آب، Q_0 درصد ترکیبات ریزپوشانی شده در فاز آبی داخلی امولسیون آب در روغن در آب

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمون‌ها با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ و با نرم افزار SPSS (version 21) مقایسه شدند.

جدول ۲- ترکیبات امولسیون دوگانه (W/O/W)

کد	امولسیون	فاز آبی داخلی	فاز آبی بیرونی
۱	پایدار شده با پروتئین آب پنیر	۵٪ عصاره زعفران	۸٪ پروتئین آب پنیر، ۲۵٪ مالتودکسترین
۲	پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین	۵٪ عصاره زعفران	۸٪ پروتئین آب پنیر، ۲٪ پکتین، ۲۵٪ مالتودکسترین
۳	پایدار شده با پروتئین آب پنیر	۱۰٪ عصاره زعفران	۸٪ پروتئین آب پنیر، ۲۵٪ مالتودکسترین
۴	پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین	۱۰٪ عصاره زعفران	۸٪ پروتئین آب پنیر، ۲٪ پکتین، ۲۵٪ مالتودکسترین



شکل ۱- توزیع اندازه ذرات میکروامولسیون اولیه آب در روغن حاوی بر اساس شدت شامل: الف- ۵٪ عصاره زعفران، ۶۲٪ روغن آفتابگردان، ۳۳٪ امولسیفایر سوربیتان مونوآلانات و ب- ۵٪ عصاره زعفران، ۶۰٪ روغن آفتابگردان، ۳۰٪ امولسیفایر سوربیتان مونوآلانات.

پیکروکروسین و سافرانال) در فاز آبی بیرونی و C_1 درصد این ترکیبات در فاز آبی داخلی می‌باشد.

بررسی اندازه ذرات

برای اندازه‌گیری اندازه و شاخص پلی دیسپرسیته قطرات امولسیون از دستگاه زتاسایزر (مدل Malvern Instruments Worcestershire ساخت کشور انگلیس) با آرگون لیزری ($\lambda = 488 \text{ nm}$) استفاده شد. اندازه گیری با زاویه پراکندگی ۹۰ درجه و در درجه حرارت ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

بررسی گرانی

گرانی امولسیون آب در روغن در آب با استفاده از گرانی سنج (مدل LVDV -II + Pro, Brookfield Engineering Laboratories ساخت کشور امریکا) بررسی گردید. بطوری که ۱۶ میلی‌لیتر از امولسیون در داخل سیلندر دستگاه ریخته و ویسکوزیته در تنش برشی 1 s^{-1} و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید (Jafari *et al*, 2012).

مدل‌سازی رهایش ترکیبات موثره زعفران

نتایج و بحث

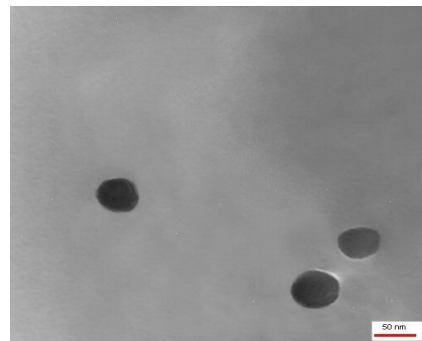
میزان ترکیبات موثره عصاره زعفران و اندازه نانوذرات تولیدی

ارزیابی کیفیت زعفران با استفاده از مقادیر کروسین (ترکیبات رنگی)، سافرانال (ترکیبات عطر) و پیکروکروسین (ترکیبات طعم) انجام می‌گیرد. با حل شدن عصاره در میکروامولسیون (اندازه ذرات ۱۰۰-۵ نانومتر می‌باشد) خواص آن مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، جذب و حل‌پذیری آن افزایش می‌یابد (Flanagan and Singh, 2006). نانوذرات تولید شده عصاره زعفران به وسیله میکروامولسیون آب در روغن دارای اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر بودند (شکل ۱). همچنین عکس میکروسکوپی نانوذرات عصاره زعفران در شکل ۲ نشان دهنده وجود ذرات یکنواخت و پوشیده شده با امولسیفایر سوربیتان مونوآلانات می‌باشد.

سینتیک رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال به فاز آبی بیرونی امولسیون دوگانه با مدل‌های ذکر شده در جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به پارامترهای ضریب برازش (R^2)، مربعات خطا (SSE) و ریشه میانگین مربعات خطا (RMSE) (جدول ۵)، در مورد رهایش کروسین بهترین مدل مربوط به مدل مرتبه اول و در مورد رهایش پیکروکروسین و سافرانال بهترین مدل مربوط به مدل مرتبه صفر بود. با توجه به جدول ۵، در طی ۲۲ روز نگهداری سرعت رهایش (k) مدل مرتبه صفر کروسین با افزایش میزان فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه (عصاره زعفران) افزایش یافت. این روند افزایش در مورد سرعت رهایش (k) مدل مرتبه اول پیکروکروسین و سافرانال نیز مشاهده گردید. میزان فاز آبی داخلی (۵ و ۱۰٪ عصاره زعفران) امولسیون دوگانه بر رهایش ترکیبات موثره زعفران از فاز داخلی دارای تاثیر معنی داری بود ($p < 0.05$). با افزایش میزان فاز آبی داخلی، اندازه قطرات آبی داخلی امولسیون دوگانه افزایش و در نتیجه رهایش ترکیبات فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی نیز افزایش یافت که مشابه نتایج Schuch و همکاران (۲۰۱۳) بود. در واقع با افزایش میزان فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه، کواسرواسیون^۲ بین قطرات داخلی افزایش یافته و همچنین قطرات بزرگ تشکیل می‌گردد که منجر به افزایش سرعت رهایش ترکیبات ریزپوشانی شده می‌گردد. علاوه بر این، افزایش میزان فاز آبی داخلی منجر به افزایش کواسرواسیون بین قطرات داخلی و گلبولهای سطحی روغن شده که منجر به کاهش ضخامت غشای روغن و مبادله آب بین دو فاز امولسیون دوگانه می‌گردد (Schuch et al, 2013).

در طی ۲۲ روز نگهداری، میزان سرعت رهایش (k) کروسین مدل مرتبه اول و (k) رهایش پیکروکروسین و سافرانال مدل مرتبه صفر امولسیون دوگانه دولایه نسبت به تک لایه کمتر می‌باشد (جدول ۵). که نشان‌دهنده رهایش کند کروسین، پیکروکروسین و سافرانال از فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه دولایه (پایدار شده با پروتئین آب پنیر-پکتین) بود. پس نوع دیواره خارجی (تک لایه، دولایه) امولسیون دوگانه بر رهایش ترکیبات موثره زعفران از فاز داخلی دارای تاثیر معنی داری بود ($p < 0.05$).

Alvarado و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی توانایی ریزپوشانی آهن با امولسیون دوگانه آب در روغن در آب نشان دادند که استحکام دیواره اطراف قطرات روغن امولسیون دوگانه (دیواره خارجی) تاثیر بارزی بر رهایش آهن محبوس شده در فاز آبی داخلی می‌گذارد. وقتی فقط از پروتئین آب پنیر بعنوان دیواره خارجی در فرمولاسیون امولسیون دوگانه استفاده می‌شود مقاومت امولسیون در برابر رهایش ترکیبات فاز آبی داخلی کاهش می‌یابد ولی در مقابل استفاده از ترکیب پروتئین آب پنیر-پکتین باعث افزایش این مقاومت



شکل ۲- عکس میکروسکوپ الکترونی نانوذرات عصاره زعفران تولید شده با میکروامولسیون

همانطوریکه در جدول ۳ مشاهده می‌گردد با افزایش درصد عصاره زعفران در میکروامولسیون، اندازه قطرات میکروامولسیون از ۵۶/۸ نانومتر به ۶۸/۴ نانومتر افزایش یافت. شاخص پلی دیسپرسیته^۱ نشان‌دهنده یکنواختی ذرات امولسیون می‌باشد و مقادیر آن از صفر برای نمونه‌های یکنواخت و کیفیت بالا تا یک برای نمونه‌های غیر یکنواخت متفاوت می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده، میکروامولسیون‌های تولید شده در این مطالعه دارای ذرات یکنواخت بوده و با افزایش درصد عصاره، شاخص پلی دیسپرسیته نیز افزایش یافت.

جدول ۳- ویژگی‌های ذرات میکروامولسیون

امولسیون	z-average (nm)	Polydispersity
میکروامولسیون حاوی ۵٪ عصاره زعفران	۵۶/۸	۰/۲۳۷
میکروامولسیون حاوی ۱۰٪ عصاره زعفران	۶۸/۴	۰/۲۲۴

بررسی سینتیک رهایش

نانوذرات عصاره زعفران با بیوپلیمرها به شکل امولسیون دوگانه (W/O/W) پوشش داده شد و رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال به فاز آبی بیرونی امولسیون دوگانه بررسی شد. برای امولسیون پایدار شده با پروتئین آب پنیر و حامل ۵٪ عصاره زعفران (فاز پراکنده امولسیون اولیه آب در روغن)، درصد رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در طی ۲۲ روز نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برابر با ۱۴/۲۸٪، ۲۳/۲۸٪ و ۲۵/۰۸٪ بود (جدول ۴). این میزان برای امولسیون حامل ۱۰٪ عصاره زعفران برابر با ۲۸/۰۳٪ کروسین، ۳۸/۰۳٪ پیکروکروسین و ۳۷/۸۶٪ سافرانال بود. در مورد امولسیون پایدار شده با پروتئین آب پنیر و پکتین و حامل ۵٪ عصاره زعفران، میزان رهایش برابر ۱۰/۹٪ کروسین، ۱۳/۸۳٪ پیکروکروسین و ۱۳/۴۰٪ سافرانال و امولسیون حامل ۱۰٪ عصاره زعفران ۱۹/۱۳٪، ۲۶/۳۵٪ و ۲۳/۴۱٪ به ترتیب برای کروسین، سافرانال و پیکروکروسین گزارش گردید (جدول ۴).

می‌گردد (Lutz et al, 2009). در واقع امولسیون‌های پایدار شده با ترکیبات ریزپوشانی شده برخوردار می‌باشند. دو لایه به علت استحکام بالای دیواره از قابلیت بالایی در حفظ

جدول ۴- راندمان ریزپوشانی کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در امولسیون دوگانه آب در روغن در آب

امولسیون	راندمان ریزپوشانی کروسین (%)		راندمان ریزپوشانی پیکروکروسین (%)		راندمان ریزپوشانی سافرانال (%)	
	روز ۱	روز ۲۲	روز ۱	روز ۲۲	روز ۱	روز ۲۲
۱	۹۷/۷۳ ^{Aa} ±۰/۲۳	۸۳/۴۵ ^{Ba} ±۰/۱۱	۹۶/۹۴ ^{Aa} ±۰/۲۸	۷۴/۳۷ ^{Ba} ±۰/۶۵	۹۵/۷۳ ^{Aa} ±۰/۷۶	۷۱/۷۳ ^{Ba} ±۰/۵
۲	۹۸/۷۳ ^{Ab} ±۰/۶۳	۸۳/۱۷ ^{Bb} ±۰/۴۸	۹۸/۲۶ ^{Ab} ±۰/۹۳	۸۷/۵۴ ^{Bb} ±۰/۲۵	۹۷/۵۵ ^{Ab} ±۰/۸۶	۸۴/۴۷ ^{Bb} ±۰/۳۹
۳	۹۲/۲۷ ^{Ac} ±۰/۸۵	۶۸/۸۵ ^{Bc} ±۰/۲۶	۹۶/۲۲ ^{Ac} ±۰/۶۱	۶۹/۲۴ ^{Bc} ±۰/۴۸	۹۴/۵۸ ^{Ac} ±۰/۳۷	۵۸/۷۷ ^{Bc} ±۰/۴۵
۴	۹۵/۸۲ ^{Ad} ±۰/۲۵	۷۳/۱۹ ^{Bd} ±۰/۳۹	۹۷/۲۸ ^{Ad} ±۰/۵۴	۷۸/۶۶ ^{Bd} ±۰/۳۴	۹۵/۳۳ ^{Ad} ±۰/۵۴	۷۳/۰/۲ ^{Bd} ±۰/۲۹

*± اعداد انحراف استاندارد.

* اعداد دارای حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند (آزمون دانکن $p < 0.05$)

ترکیب کد	کروسین				پیکرو کروسین				سافرانال			
	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴
مرتب‌ب صفر	۰/۶۸	۰/۵۱	۱/۲۸	۰/۸۸۶	۱/۲۲	۰/۶۴	۱/۷۲	۱/۲	۱/۱۴	۰/۹۶	۱/۷	۱/۰۶
	۰/۹۱	۰/۸۷	۰/۹۴	۰/۸۸۳	۰/۸۳۳	۰/۹۰۶	۰/۹۵۶	۰/۸۳	۰/۹۶	۰/۹۱	۰/۹۶۴	۰/۹۵۱
	۰/۰۳۳	۰/۰۲۵	۰/۰۶	۰/۰۷۲	۰/۰۹۷	۰/۰۲	۰/۰۴۹	۰/۰۸۷	۰/۰۴۵	۰/۰۲۵	۰/۰۶	۰/۰۳۸
	۰/۰۸	۰/۷۱	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۱۳۹	۰/۰۶۴	۰/۰۹۹	۰/۱۳۲	۰/۰۹۵	۰/۰۷۱	۰/۱۱	۰/۰۸۷
مرتب‌ب اول	۰/۰۹۴	۰/۰۹۳	۰/۰۹۹	۰/۰۹۷	۰/۰۹۴	۰/۱	۰/۰۱۴	۰/۰۱۷۲	۰/۰۹	۰/۰۸۷	۰/۰۹۶	۰/۰۹
	۰/۹۵۹	۰/۹۴۷	۰/۹۰۶	۰/۹۵۵	۰/۹	۰/۹۲	۰/۸	۰/۸۲	۰/۸	۰/۸۵	۰/۸۸	۰/۸۴
	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۵ - ۰/۴۹	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۴
	۰/۰۰۶۷	۰/۰۰۷۹	۰/۰۰۸۸	۰/۰۰۶۶	۰/۰۱۷	۰/۰۰۲۲	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۹۱	۰/۰۱۶	۰/۰۱۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱
هیگچی	۵/۹۵	۳/۶	۸/۵۶	۵/۲۳	۶/۲۴	۸/۳۲	۳/۲۳	۴/۷۵	۵/۹۵	۲/۶۱	۳/۶	۸/۵۶
	۰/۹۴	۰/۷۴	۰/۹۵	۰/۸۸	۰/۱۱۷	۰/۰۰۹	۰/۰۱۴	۰/۰۰۷	۰/۹۴	۰/۵۲	۰/۷۴	۰/۹۵
	۰/۱۶۸	۱/۰۴	۱/۴۷۶	۰/۸۸	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲۹	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۳۲	۰/۱۶۸	۰/۸۴۲	۱/۰۴	۱/۴۷
	۰/۴۱۷	۰/۴۵۶	۰/۵۴۳	۰/۴۲	۰/۰۲۴۶	۰/۰۲۴۱	۰/۰۲۳۹	۰/۰۲۵۳	۰/۴۱۷	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۵۴
هیگسون کراول	۰/۱۱۵	۰/۱۱۳	۰/۱۲۹	۰/۱۲۴	۶/۲۴	۰/۱۱	۰/۰۰۳	۰/۰۲۴۶	۰/۱۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۱۰۵
	۰/۰۴۸	۰/۰۲۲	۰/۱۰۲	۰/۰۷۳	۸/۳۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۲۹	۰/۰۲۴۱	۰/۰۸۷	۰/۰۵۶	۰/۰۵۶	۰/۰۸۷
	۰/۰۰۴۴	۰/۰۰۴۹	۰/۰۰۳۷	۰/۰۰۴۹	۳/۲۳	۰/۰۱۴	۰/۰۰۲۸	۰/۰۲۳۹	۰/۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۱
	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۵۴	۰/۴۲	۴/۷۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳۲	۰/۰۲۵۳	۰/۱	۰/۰۸	۰/۱	۰/۱۲

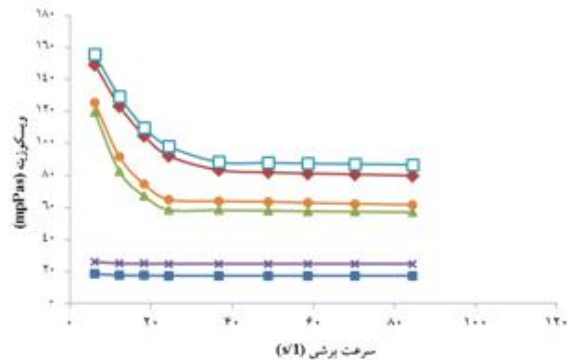
باعث افزایش ویسکوزیته امولسیون دوگانه می‌گردد. با افزایش فاز پراکنده امولسیون اولیه، اندازه قطرات امولسیون نهایی آب در روغن در آب افزایش یافته و در نتیجه افزایش میزان برخورد قطرات با یکدیگر، ویسکوزیته امولسیون نیز افزایش می‌یابد. با توجه به شکل ۳، امولسیون پایدار شده با دو دیواره پروتئین آب پنیر و پکتین رفتار غیر نیوتنی شبه‌پلاستیک و امولسیون پایدار شده با پروتئین آب پنیر رفتار نیوتنی از خود نشان دادند. در واقع ترکیب پکتین و پروتئین آب پنیر از سیالیت امولسیون کاسته و میزان ویسکوزیته آن را افزایش می‌دهد (Olivieri et al, 2003; Lutz et al, 2003).

بررسی گرانروی و رفتار جریان‌ی امولسیون‌ها

یافته‌های ما نشان داد که ویسکوزیته امولسیون‌های پایدار شده با دو دیواره (پروتئین آب پنیر و پکتین) بیشتر از ویسکوزیته امولسیون‌های پایدار شده با پروتئین آب پنیر به تنهایی بود. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده پایداری بالای امولسیون‌های دارای دو دیواره باشد. ویسکوزیته امولسیون اکثراً به آزادی حرکت آب فاز پیوسته بستگی دارد. وقتی از محلول پکتین و پروتئین آب پنیر بعنوان فاز پیوسته استفاده شد، میزان آزادی حرکت آب کاهش یافته و در نتیجه ویسکوزیته امولسیون افزایش می‌یابد. افزایش میزان فاز پراکنده (عصاره زعفران) امولسیون اولیه آب در روغن از ۵٪ به ۱۰٪

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، امولسیون دوگانه آب در روغن در آب به عنوان یک حامل مناسب برای انتقال و کنترل رهایش ترکیبات موثره زعفران طراحی گردید. در پایداری امولسیون از بیوپلیمرهای خوراکی استفاده گردید تا بتوان از آنها در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود. نتایج نشان داد که امولسیون دوگانه آب در روغن در آب پایدار شده با کمپلکس پروتئین آب پنیر و پکتین به علت کاربرد دو دیواره در فرمولاسیون آن، ترکیبات موثره زعفران را بهتر حفظ می‌نماید. همچنین مدل‌های مرتبه صفر، مرتبه اول به عنوان مدل‌های مناسب جهت بررسی سینتیک رهایش ترکیبات موثره زعفران از فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی پیشنهاد گردیدند.



شکل ۳: تاثیر مواد دیواره و درصد فاز پراکنده (عصاره زعفران) امولسیون اولیه (آب در روغن) بر ویسکوزیته و رفتار رئولوژیکی امولسیون نهایی آب در روغن در آب. ■ پایدار شده با پروتئین آب پنیر (۵٪ عصاره زعفران)، × پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین (۵٪ عصاره زعفران)، ● پایدار شده با پروتئین آب پنیر (۱۰٪ عصاره زعفران)، ▲ پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین (۱۰٪ عصاره زعفران).

منابع

- Bouyer, E., G. Mekhloufi, et al. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field, *International Journal of Pharmaceutics* 436(1-2): 359-378.
- Chen, Y., Zhang, H., Tian, X., Zhao, C., Cai, L., Liu, Y., Jia, L., Yin, H.X. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *gardenia jasminoides ellis* and *crocus sativus L.*: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chemistry*. 109(3):484-492.
- Chu, L.Y., Utada, A.S., Shah, R.K., Kim, J.W., Weitz, D.A., 2007. Controllable monodisperse multiple emulsions. *Angewandte Chemie-International Edition* 46, 8970-8974.
- Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M., & Shahidi, F. (2013). Hesperetin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carriers for food fortification: preparation, characterization, and modeling. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1464-1475.
- Flanagan, J., Singh, H. (2006). Recent advances in the delivery using microemulsions of food-delivered bioactives and drugs. In M. R. Mozafari (Ed.), *Nanocarrier technologies* (pp. 95e111). *Netherlands*: Springer.
- Giroux, H. J., S. Constantineau, et al. (2013). Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal* 29(2): 107-114.
- ISO/TS 3632-1,2 (2003). Saffron (*Crocus sativus L.*) Part 1: Specifications, Part 2: Test Methods; Geneva, Switzerland: ISO.
- Jafari SM, Beheshti P, Assadpoor E (2012) Rheological behavior and stability of D-limonene emulsions made by a novel hydrocolloid (Angum gum) compared with Arabic gum. *J Food Eng* 109(1):1-8.
- Jager-Lezer, N., I. Terrisse, et al. (1997). Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion. *Journal of Controlled Release* 45(1): 1-13.
- Jiménez-Alvarado R, Beristain CI, Medina-Torres L, Román-Guerrero A, Vernon-Carter EJ (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by proteipolysaccharide complexes. *Food Hydrocoll* 2009; 23: 2424-33.
- Kumapati, P., Suresh, K.A., Sathiyavedu, T.S and Arabandi, R. (2003). Inhibitory effects of aqueous crude extract of Saffron (*Crocus sativus L.*) on chemical-induced genotoxicity in mice. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 12 (4): 474-476.
- Lobato-Calleros, C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, R., (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution

- image analyses. *Food Research International* 39(6): 678-685.
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, Louise., Garti, Nissim., (2009). Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74(1): 178-185.
- Magdassi, S. and N. Garti (1986). "A kinetic model for release of electrolytes from w/o/w multiple emulsions." *Journal of Controlled Release* 3(1-4): 273-277.
- Moraga, A.R., Nohales, P., Perez, J. and Gomez-Gomez, L. (2004). Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *crocus sativus* stigmas. *Planta*.219(6):955-966.
- Olivieri, Laetitia., Seiller, Seiller., Bromberg, Lev., Besnard, Madeleine., Duong, Thi-Nhat-Lien., Grossiord, Jean-Louis. (2003). Optimization of a thermally reversible W/O/W multiple emulsion for shear-induced drug release. *Journal of Controlled Release* 88(3): 401-412.
- Pays, K., J. Giermanska-Kahn, et al. (2002). "Double emulsions: how does release occur?" *Journal of Controlled Release* 79(1-3): 193-205.
- Raynal, S., Grossiord, J. L., Seiller, M., Claussed, D. (1993). A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release. *Journal of Controlled Release*, 26(2): 129-140.
- Raynal, S., J. L. Grossiord, et al. (1993). "A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release." *Journal of Controlled Release* 26(2): 129-140.
- Regan, J. O. and D. M. Mulvihill (2009). Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23(8): 2339-2345.
- Sadeghi, S., Madadlou, A., Yarmand, Mohamadsaeed., (2014). Microemulsification–cold gelation of whey proteins for nanoencapsulation of date palm pit extract. *Food Hydrocolloids*, 35(0): 590-596.
- Sapei, L., M. A. Naqvi, et al. (2012). "Stability and release properties of double emulsions for food applications." *Food Hydrocolloids* 27(2): 316-323.
- Schuch, Anna. Deiters, Philipp. Henne, Julius. Kohler, P. Schuchmann, Karsten Heike. (2013). Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 402 (2013): 157–164.
- Siepmann, J. and F. Siepmann (2008). "Mathematical modeling of drug delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 364(2): 328-343.
- Zeng, Y., Yan, F., Tang, L. and Chen, F. 2003. Increased crosin production and induction frequency of stigma-like-structure from floral organs of *crocus sativus* L. By precursor feeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.72(2): 185-191.

Release modeling of Nano-encapsulated bioactive compounds of saffron from inner phase of W/O/W double emulsions

A. Faridi Esfanjani¹, S. M. Jafari ^{*2}, E. Assadpour³, H. Mirzaei⁴

Received: 2014.09.27

Accepted: 2015.02.25

Introduction: Controlling and targeting release of bioactive compounds have a key role in improving their functional properties such as antioxidant and anti-disease activities. Encapsulation is one of the best methods for protection and controlling release of bioactive ingredients. Indeed, in this process, protection and controlling release of ingredients as core materials are performed by surrounding of them via variety of wall materials. Emulsions are most popular encapsulation systems that are classified in variety types such as single layer emulsion, multi-layer emulsion, doubleemulsion, and etc. Hydrophilic bioactive compounds can be loaded in inner aqueous phase of water in oil in water (W/O/W) double-emulsions. The stability of doubleemulsions is low due to presence of two interfaces in them. Applying a thermodynamically stable W/O emulsion (e.g., micro-emulsion) as a primary emulsion and using of complex biopolymers as emulsifier and stabilizer in outer phase of doubleemulsions can improve their stability (Dickinson, 2011; Boyer et al, 2012).

Saffron bioactive compounds include crocin, picrocrocin, and saffranal are widely used for a variety of functional and healthy goals in food and pharmaceutical industries. These compounds have many different functions, including anti-carcinogenic, anti-oxidant, anti-depressant, anti-apoptotic, anti-tussive, anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-thrombotic properties (Moraga et al, 2004).

In the present study, our main goal was kinetically evaluated release of crocin, picrocrocin and saffranal from inner phase to outer phase of doubleemulsion during 22 days storage by Zero order, First order, Higuchi, and Hixson-Crowell.

Materials and method: Saffron was provided from Torbatheydariyeh farms, Khorasan-e-razavi, Iran. Sunflower oil and sodium azide were purchased from FRICO (Sirjan, Iran) and Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), respectively. Whey protein concentrate (80% protein) and sorbitanmonooleate (span 80) were obtained from Sapoto cheese (USA) and Merck (Germany), respectively. Maltodextrin was obtained from Qinhuangdao starch Co. (DE 16-20, China) and citrus pectin with a degree of methyl esterification of 71.1% and galacturonic acid >65% was purchased from MP biomedical (Netherland). All other chemicals used in this study were of analytical grade.

For extraction of crocin, picrocrocin and saffranal, a total of 10 grams of saffron sample was macerated in 150 mL of water in a glass bottle, covered with aluminum foil (to prevent direct exposure to light), and was placed in an incubator shaker (Kavooshmega, Iran) for 24 hours at 30°C. Then, this solution was homogenized (10000 rpm for 10 minutes, HeidolphSilentcrusher, Germany) for maximum extraction of saffron compounds. Finally, the extract was filtered under vacuum by using a Whatman No. 1 (11 mm) filter paper, and kept in the freezer at -18°C prior to any examination. ISO/TS 3632 procedure (2003) was used for the measurement of saffron compounds.

The doubleemulsions were prepared in two-step:

- (a) First, primary W/O micro-emulsions were produced by two formulations: 60:30:10% and 62:33:5% of sunflower oil, span 80, and saffron extract, respectively.
- (b) Then, the W/O micro-emulsions was gradually added into the outer aqueous phase contains whey protein concentrate (WPC)/maltodextrin or WPC/pectin/maltodextrin while blending by a homogenizer (12000 rpm for 5 minutes at 10°C, HeidolphSilentcrusher, Germany) and then these coarse emulsions were further emulsified using mentioned homogenizer (15000 rpm for 8 minutes at 10°C). All doubleemulsions were composed of 25% primary emulsion and 75% outer aqueous phase

Droplet size of doubleemulsions after one day and 22 days storage weremeasured using Zetasizer (Malvern

1 And 3- Former MSc and PhD students, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

2 and 4- Associate Professors, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

(*-Corresponding Author Email: smjafari@gau.ac.ir)

Instruments, Worcestershire, UK).

The released components in the outer aqueous phase were measured by evaluation of encapsulation efficiency of the ratio of crocin, picrocrocin, and saffranal at a specific time:

$$E (\%) = 100 - (C_2 \times 100 / C_1) \quad (1)$$

Where C_2 is the percentage of crocin, picrocrocin and saffranal in outer aqueous phase and C_1 equals to the percentage of compounds in inner aqueous phase.

C_2 is a released into outer aqueous phase relative to the total amount present in the outer aqueous phase if all compounds were released (M_∞).

The viscosity of emulsions was measured using a programmable viscometer (model LVDV -II + Pro, Brookfield Engineering Laboratories, USA) and by a ULA spindle.

The released are kinetically evaluated by Zero order, First order, Higuchi, and Hixson-Crowell.

The experiments were all carried out in triplicate. The collected data were analyzed by one-way ANOVA; the means were compared by the Duncan's multiple range tests at the 5% level through SPSS version 21 (IBM, USA).

Results and Discussion: As shown in fig. 1, the droplet size of produced W/O micro-emulsions were lower than 200 nm. In fact, these droplets are water droplets containing bioactive compounds of saffron dispersed within oil phase that surrounded with Span 80 (Fig. 2). Also, it was found that by increase of saffron extract (from 5% to 10%) as dispersed phase in W/O micro-emulsions, droplet size and poly-dispersity index (PDI) were significantly ($P < 0.05$) affected (Table. 3).

As shown in table. 4, crocin, picrocrocin, and saffranal had a same release trend, but the release rate of crocin was lower than saffranal and picrocrocin. As regard to R^2 , SSE, and RMSE from kinetic modeling in table. 5, the first order was a best model for release of crocin, and zero order was a best model for release of picrocrocin and saffranal. Also, kinetic data of release showed that the high release of crocin, saffranal, and picrocrocin was observed by increasing the dispersed phase content of primary W/O micro-emulsion and also it was found that WPC/pectin delayed the release of encapsulated ingredients more than single WPC (Table. 5). Indeed, the using of complex biopolymers as the external binary film of double emulsions causes a resistance to release for inner compounds (Dickinson, 2011).

As shown in fig. 3, the viscosity of double emulsions stability with WPC/pectin complex was higher than double emulsions stabilized by only WPC. This can confirm the higher stability of stabilized double emulsions with complex biopolymers (Olivieri *et al*, 2003).

Keywords: Release, Nanoencapsulation, W/O/W double emulsion, saffron.

بررسی حضور قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در پسته منطقه خراسان (شهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد) با استفاده از روش مولکولی

نسیم پورابراهیم^۱، مسعود یاورمنش^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۷

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های مولد آفلاتوکسین با شمارش کپک و مخمر، شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل و درصد رطوبت در پسته خام بود. بدین منظور نمونه‌برداری از مناطق مختلف کشت پسته در شهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد انجام شد. در این تحقیق، ۳۰ جدایه قارچی متعلق به جنس آسپرژیلوس شناسایی و به کمک روش‌های مبتنی بر کشت و با استفاده از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار خالص‌سازی شدند. شناسایی جنس آسپرژیلوس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط جفت آغازگر اختصاصی Asp1/Asp2 جهت تکثیر ناحیه rRNA 18S انجام گردید. همچنین ردیابی ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفلاتوکسین توسط ۳ جفت آغازگر APA-450/APA-*ver1/ver2*، 1482 و OMT-208/OMT-1232 صورت گرفت. از میان ۳۰ جدایه قارچی، ۱۲ نمونه حاوی ژن *omtA* و ۴ نمونه حاوی ژن *ver1* بودند. در هیچ‌یک از جدایه‌های قارچی ژن تنظیمی *aflR* مشاهده نشد. نتایج بدست آمده نشان داد که هرچند بعضی از جدایه‌ها یک یا دو ژن ساختاری دخیل در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین را دارند ولی با توجه به عدم حضور ژن تنظیمی *aflR* بصورت بالقوه قادر به تولید آفلاتوکسین نمی‌باشند. جهت بررسی رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های مولد آفلاتوکسین در پسته، ضریب همبستگی محاسبه گردید. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که همبستگی بالایی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *ver1* و *omtA* بر اساس دامنه رطوبت وجود دارد ($p < 0.05$)، در حالی که بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های مذکور در دامنه‌های مختلف شمارش کپک و مخمر و همچنین شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل، رابطه معنی‌داری وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس، آفلاتوکسین، پسته، ژن‌های مولد آفلاتوکسین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

پسته یکی از محبوب‌ترین مغزهای درختی است. در میان گونه‌های مختلف جنس پیستاسا^۱، تنها میوه‌های مربوط به گونه پیستاساورته^۲ با توجه به اندازه مطلوبی که دارند، بعنوان مغز خوراکی مورد پسند مصرف‌کنندگان می‌باشد (Shokraii and Esen, 1988). کشت پسته در مناطق کویری و خشک ایران انجام می‌شود که در این مناطق میزان بارندگی بسیار ناچیز و از نظر اقتصادی برای تولید سایر

محصولات کشاورزی مطلوب نمی‌باشد. در سال‌های اخیر درآمد ارزی حاصل از صادرات پسته پس از نفت قرار گرفته است و حدود ۱۰ درصد از ارزش صادرات غیر نفتی مربوط به این محصول بوده است (Sedaghat, 2011). براساس آخرین آمار منتشرشده توسط سازمان خواروبار و کشاورزی جهانی (فائو^۳)، ایران با ۴۷۲۰۹۷ تن، ایالت متحده آمریکا با ۲۳۱۰۰۰ تن، ترکیه با ۱۵۰۰۰۰ تن، چین با ۷۴۰۰۰ تن و سوریه با ۵۷۱۹۵ تن پنج تولیدکننده بزرگ پسته در سال ۲۰۱۲ بوده‌اند (FAOSTAT, 2012).

آلودگی پسته به گونه‌های قارچ آسپرژیلوس و مایکوتوکسین‌های آن، مهمترین معضل در زمینه مصرف و صادرات این محصول محسوب می‌شود (kabirian et al., 2011). آفلاتوکسین‌ها ۸ که گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها را تشکیل می‌دهند، متابولیت‌های ثانویه با اثرات سمی، سرطان‌زایی و جهش‌زایی هستند که بطور عمده

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

* - نویسنده مسئول: (Email: yavarmanesh@um.ac.ir)

ساختاری (*omtA* و *ver1* *nor1*) کدکننده آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز آفاتوکسین و ژن تنظیمی *aflR* استفاده نمود (Geisen, 1996; Shapira *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002;) (Criseo *et al.*, 2001).

با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی آفاتوکسین‌ها، هدف از انجام این پژوهش شناسایی جدایی‌های قارچی متعلق به جنس آسپرژیلوس و ردیابی ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفاتوکسین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط جفت آغازگرهای اختصاصی، همچنین بررسی رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های مولد آفاتوکسین با متغیرهای اندازه‌گیری شده (میزان رطوبت پسته، شمارش میکروارگانیسم‌های مزوفیل و شمارش کپک و مخمر) در نمونه‌های پسته جمع‌آوری شده از شهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد بود.

مواد و روش

جمع‌آوری نمونه‌ها

در شهریورماه ۱۳۹۲، ۳۰ نمونه پسته خام متعلق به مناطق مختلف کشت پسته در شهرستان‌های گناباد و فیض‌آباد، طبق روش نمونه‌برداری از مغزهای درختی برای آزمون آفاتوکسین و به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید (استاندارد ملی ایران، شماره ۱۳۵۳۴). نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار بسته‌بندی و پس از انتقال به آزمایشگاه، تا انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند.

اندازه‌گیری رطوبت

رطوبت نمونه‌های پسته با استفاده از روش حرارتی و براساس اختلاف وزن نمونه‌ها قبل و بعد از خشک کردن در دمای ۹۵-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید (استاندارد ملی ایران، شماره ۲۱۸).

شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها

بمنظور شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، از محیط کشت پلیت کانت آگار^۱ طبق استاندارد ملی ایران، شماره ۵۲۷۲ استفاده شد.

شناسایی و شمارش کپک‌ها و مخمرها

کشت کپک‌ها و مخمرها با استفاده از محیط کشت یست گلوکز کلرامفنیکل آگار^۲ صورت گرفت. در پایان دوره گرمخانه‌گذاری نتایج شمارش بصورت واحدهای تشکیل دهنده پرگنه^۳ در هر گرم از نمونه گزارش شدند. شناسایی کپک‌ها در سطح جنس با مشاهده

توسط گونه‌های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* تولید می‌شوند (Calvo *et al.*, 2002). همچنین برخی از گونه‌های دیگر آسپرژیلوس از جمله *Aspergillus nomius*، *Aspergillus bombycis*، *Aspergillus pseudotamarii* و *Aspergillus ochraceoroseus* مولد آفاتوکسین گزارش شده‌اند (Wen *et al.*, 2004). آفاتوکسین‌ها در سطح وسیعی از مواد غذایی و محصولات کشاورزی شامل ذرت، بادام زمینی، مغزهای درختی و دانه‌های روغنی مشاهده می‌شوند (Razzaghi *et al.*, 2011).

تولید مایکوتوکسین‌ها از جمله آفاتوکسین‌ها توسط عوامل مختلف نظیر ویژگی‌های ژنتیکی قارچ‌های مولد و محیط فیزیکیوشیمیایی که در آن رشد می‌کنند تحت تاثیر قرار می‌گیرد (علامه و رزاقی، ۱۳۸۰). در میان عوامل محیطی مختلف، درجه حرارت و رطوبت نسبی مهمترین فاکتورهای موثر در تولید آفاتوکسین می‌باشند. تولید بهینه آفاتوکسین در دامنه دمایی ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است (OBrian *et al.*, 2007). مطالعات انجام شده نشان داده که درجه حرارت و رطوبت نسبی بهینه برای تولید آفاتوکسین در پسته و فندق، به ترتیب ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۹۹-۹۷٪ می‌باشند (Diener and Davis 1967; Simsek *et al.*, 2002).

بسیاری از کشورها مقررات ویژه‌ای برای تولید، مصرف و واردات مواد غذایی و دارویی در جهت مقابله با خطرات جدی ناشی از مایکوتوکسین‌ها وضع نموده‌اند (علامه و رزاقی، ۱۳۸۰). اتحادیه اروپا در سال ۲۰۱۰ حد مجاز برای آفاتوکسین B₁ را مقدار ۸ ppb برای مجموع آفاتوکسین‌ها ۱۰ ppb تعیین نموده است (European Commission, 2010). در ایالات متحده آمریکا، مواد غذایی یا دارویی که بیش از ۲۰ ppb آفاتوکسین داشته باشند، از نظر قانونی برای فروش، واردات و صادرات ممنوع شده‌اند (Trial *et al.*, 1995; Gourama and Bullerman, 1995).

بمنظور ارزیابی کیفیت مواد غذایی و نیز بررسی حضور مایکوتوکسین‌ها، شناسایی قارچ‌های توکسین‌زا امری ضروریست (Suanthie *et al.*, 2009). روش‌های مرسوم جهت تشخیص قارچ‌ها در مواد غذایی بر اساس روش‌های مبتنی بر کشت و صفات میکروسکوپی، نیازمند کار آزمایشگاهی فشرده بوده و بسیار وقت‌گیر می‌باشند (Shapira *et al.*, 1996). اخیراً روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، بدلیل حساسیت بالا، اختصاصی و سریع بودن، تبدیل به یک ابزار مقتدر جهت تشخیص قارچ‌های توکسین‌زا گردیده است (Konietzny and Greiner 2003).

بسیاری از ژن‌های دخیل در بیوسنتز مایکوتوکسین‌ها شناسایی شده‌اند و توالی DNA آن‌ها منتشر شده است. از روش PCR می‌توان برای تشخیص آسپرژیلوس‌های مولد آفاتوکسین بر پایه ژن‌های

1 Plate Count Agar (PCA)

2 Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar

3 CFU

میکروسکوپی و براساس ساختمان کپک انجام شد (استاندارد ملی ایران، شماره ۲-۱۰۸۹۹).

خالص‌سازی کپک‌ها

خالص‌سازی جدایه‌های قارچی با استفاده از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار^۱ انجام شد (Rahimi et al., 2008). خالص‌سازی توسط آنس سوزنی استریل از جدایه‌های اسپریلوس برداشته شد و در پلیت حاوی پوتیتو دکستروز آگار در ۳ نقطه دور از هم کشت گردید. پلیت‌ها در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند

استخراج DNA

بمنظور رشد میسلیوم قارچی و استخراج DNA از محیط کشت پوتیتو دکستروز برات^۲ استفاده گردید. گرمخانه‌گذاری درون انکوباتور شیکردار (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. توده میسلیومی حاصل منجمد و توسط نیتروژن مایع تبدیل به پودر یکنواختی گردید (Shapira et al., 1996; Rahimi et al., 2008). استخراج DNA به روش کلاسیک، بر پایه قرار دادن نمونه‌ها در معرض بافر استخراج CTAB^۳ (دویل و دویل^۴)، تخلیص با حلال‌های آلی مانند کلروفرم/ایزوامیل‌الکل و در نهایت ترسیب توسط ایزوپروپانول سرد صورت گرفت (Konietzny and Greiner, 2003). DNAهای حاصل در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده در مراحل بعدی نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از یک جفت آغازگراختصاصی جنس اسپریلوس (*Asp1/Asp2*) و ۳ جفت آغازگر APA-OMT-208/OMT-1232 و *ver1/ver2*, 450/APA-1482 (جدول ۱) جهت ردیابی ژن‌های دخیل در تولید آفلاتوکسین انجام شد (Shapira et al. 1996; Melchers et al. 1994). اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر کیت رد مستر میکس PCR و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول ۲ آمده است. برای مشاهده محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، الکتروفورز با شدت ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت در ژل آگارز ۱٪ و بافر تی بی ای^۵ انجام

گردید. عکس‌برداری از قطعات DNA رنگ‌آمیزی شده توسط گرین و یوراع^۶ با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت^۷، تحت نور ماوراءبنفش صورت گرفت. محصولات واکنش PCR به همراه آغازگرهای شناسایی ژن‌های مولد آفلاتوکسین بمنظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و توالی‌یابی یک‌طرفه قطعات مورد نظر با آغازگرهای رفت صورت گرفت. توالی‌های بدست آمده با استفاده از الگوریتم BLAST^۸ موجود در پایگاه ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکتولوژی^۹ با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

رابطه احتمالی بین حضور کپک اسپریلوس و ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفلاتوکسین با متغیرهای اندازه‌گیری شده (شمارش میکروارگانیسیم‌های مزوفیل، شمارش کپک و مخمر و میزان رطوبت پسته) در نمونه‌های پسته (جدول ۳)، توسط نرم افزار Minitab و با محاسبه ضریب همبستگی^{۱۰} مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه‌های قارچی

قارچ‌های آلوده‌کننده نمونه‌های پسته، بلحاظ شکل ظاهری، رنگ پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند و ۳۰ جدایه قارچی متعلق به جنس اسپریلوس شناسایی شدند. در زیر میکروسکوپ کونیدیفورهای مستقیم مشاهده گردید که در انتها به یک وزیکول پوشیده شده با لایه‌ای از فیالیدهای فلاسکی شکل ختم می‌شد و کنیدی‌های تک سلولی و کروی شکل شفاف یا رنگی، به‌صورت زنجیر به استریگما متصل شده بودند (Vyzantiadis et al., 2012). جدایه‌های شناسایی شده به دو رنگ سبز مایل به زرد و سبزه تیره بودند.

در مطالعه‌ای که Mojtabehi و همکاران (۱۹۷۹) بر روی پسته ایران انجام دادند، فلور قارچ اصلی روی میوه پسته اسپریلوس معرفی شد. در این تحقیق، ۱۳ گونه اسپریلوس از میوه‌های پسته گزارش شدند که گونه غالب *A.niger* تعیین گردید. رحیمی و همکاران (۱۳۸۶) نیز بیش از ۲۳۰ جدایه قارچی از میوه‌های پسته باغ‌های اصفهان، کرمان و رفسنجان، انبارها و همچنین نخاله‌های پسته ریخته شده در باغ‌های مختلف بدست آوردند که بر اساس مطالعات مورفولوژیکی، ۱۷۰ جدایه متعلق به گونه‌های مختلف اسپریلوس

6 Green viewer

7 Gel Documentation

8 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

9 National Center for Biotechnology Information (NCBI)

10 Coefficient of Correlation

1 Potato Dextrose Agar (PDA)

2 Potato Dextrose Broth (PDB)

3 Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

4 Doyle and Doyle

5 TBE

بودند. در میان اسپرژیلوس‌های جمع‌آوری شده از باغ‌های پسته *A. niger* بیشترین فراوانی را داشت و پس از آن *A. flavus*، *A. ochraceus* و *A. terreus* قرار داشتند.

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

در این مطالعه، PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی شناسایی جنس اسپرژیلوس (*Asp1/Asp2*) جهت تکثیر ناحیه 18S rRNA انجام شد و در تمامی جدایه‌های جداسازی شده از نمونه‌های پسته یک باند DNA در حدود ۳۶۳ جفت باز مشاهده گردید. همچنین ردیابی ژن‌های مسیر بیوسنتز آفاتوکسین توسط آغازگرهای *ver1/ver2*، *omt-208/omt-1232* و *apa-450/apa-1482* صورت گرفت. نتایج نشان داد که از میان ۳۰ جدایه قارچی، ۱۲ نمونه با توجه به تولید قطعات با اندازه ۱۰۲۴ جفت باز، حاوی ژن *omtA* و ۴ نمونه با ایجاد باندهای ۵۳۷ جفت بازی، حاوی ژن *ver1* می‌باشند (شکل ۱)، در حالی که در هیچ‌یک از جدایه‌های قارچی ژن تنظیمی *aflR* مشاهده نشد. همچنین بررسی نتایج توالی‌یابی یک‌طرفه قطعات حاصل از PCR و مقایسه آن با داده‌های پایگاه اطلاعاتی بانک ژن DNA، تشابه کامل این توالی را با ژن هدف نشان داد.

در تحقیقی که توسط نجفی و همکاران (۱۳۸۸) روی نمونه‌های پسته صورت گرفت، با استفاده از ژن تنظیمی مسیر بیوسنتز آفاتوکسین (*aflR*)، PCR اختصاصی جهت شناسایی جدایه‌های توکسین‌زا به کمک دو آغازگر *aflR-1* و *aflR-2* انجام شد که در تمامی جدایه‌های جداسازی شده از پسته یک باند DNA در حدود

۷۹۸ جفت باز مشاهده گردید. همچنین در مطالعه دیگری Rahimi و همکاران (۲۰۰۸) به منظور بررسی و شناسایی جدایه‌های اسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس موجود در نمونه‌های پسته از دو جفت آغازگر اختصاصی ژن‌های تنظیمی *aflR* و *aflJ* (F/aflR-R) و (aflR-F/aflR-R) استفاده کردند که در تمامی جدایه‌های اسپرژیلوس پارازیتیکوس و ۳۳ جدایه اسپرژیلوس فلاووس جداسازی شده از پسته، با استفاده از جفت آغازگر *aflR* یک باند DNA در حدود ۶۲۹ جفت باز مشاهده گردید، در حالی که جفت آغازگر اختصاصی *aflJ* تنها در ۳۹ جدایه اسپرژیلوس فلاووس، یک قطعه ۸۴۰ جفت بازی را تکثیر نمود. از میان جدایه‌های اسپرژیلوس فلاووس مورد بررسی، ۱۹ جدایه با هر دو آغازگر *aflR* و *aflJ* نتایج مثبتی را نشان دادند.

گرچه *omtA* و *ver1* ژن‌های ساختمانی هستند که در مسیر بیوسنتز آفاتوکسین عمل نموده و در تولید آنزیم‌های کلیدی برای تولید آفاتوکسین ضروری هستند (Geisen, 1996)، اما مطالعات نشان داده است که در مسیر بیوسنتز آفاتوکسین یکسری ژن تنظیم‌کننده مانند *aflR* وجود دارد که بر روی ژن‌های ساختاری تاثیر گذارده و باعث فعال‌سازی نسخه‌بردای در آن‌ها می‌شود. در صورت عدم وجود این ژن‌ها قارچ قادر به تولید سم نخواهد بود (ارمی و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان می‌دهد که هر چند بعضی از جدایه‌ها یک یا دو ژن ساختاری دخیل در مسیر بیوسنتز آفاتوکسین را دارند ولی با توجه به عدم حضور ژن تنظیمی *aflR* بصورت بالقوه قادر به تولید آفاتوکسین نمی‌باشند.

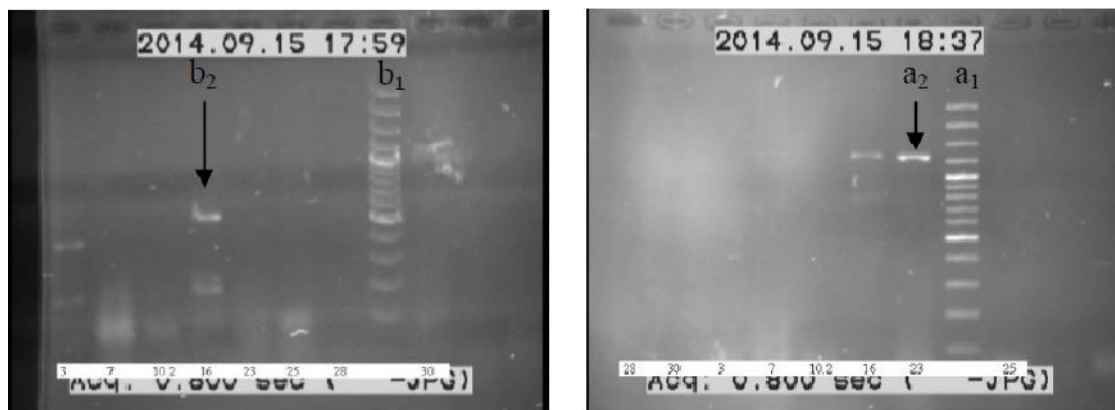
جدول ۱- آغازگرهای مخصوص شناسایی جنس اسپرژیلوس و ژن‌های مولد آفاتوکسین

منبع	اندازه محصول PCR (bp)	توالی آغازگر (۵'→۳')	ژن هدف	آغازگر
Melchers et al. 1994	۳۶۳	CGGCCCTTAAATAGCCCGGTC ACCCCCCTGAGCCAGTCCG		Asp1 Asp2
Schnerr et al., 2002	۱۰۳۲	TATCTCCCCCGGGCATCTCCCGG CCGTCAGACAGCCACTGGACACGG	<i>aflR</i>	APA-450 APA-1482
Geisen, 1996	۵۳۷	GCCGCAGGCGGGAGAAAGTGGT GGGATATACTCCCGACACAGCC	<i>ver 1</i>	Ver1 Ver2
Schnerr et al., 2002	۱۰۲۴	GGCCCGTTTCCTTGCTCCTAAGC CGCCCCAGTGAGACCCTTCTCG	<i>Omt A</i>	OMT-208 OMT-1232

جدول ۲- برنامه زمانی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت ردیابی ژن‌های مولد آفاتوکسین

نام مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
واسرشت سازی ^۱	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال پرایمرها ^۲	۶۵	۳۵ ثانیه	۳۵
سنتز قطعه مورد نظر	۷۲	۴۰ ثانیه	۳۵
گسترش نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

1 Denaturation
2 Annealing

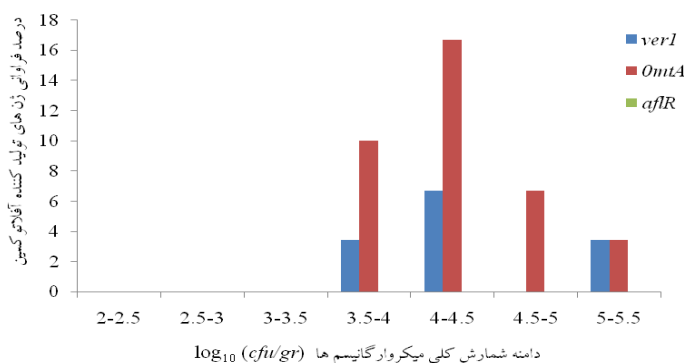


شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪
 a₁ و b₁ نشانگر مولکولی ۱۰۰۰ bp، a₂ و OmtA (۱۰۲۴bp) و b₂ و ver1 (۵۳۷ bp)

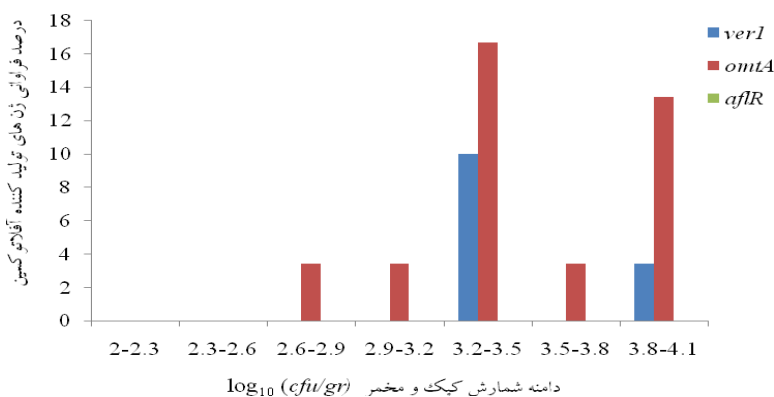
بررسی میزان فراوانی ژن‌های مولد آفاتوکسین در نمونه‌های پسته خام

در این مطالعه میزان فراوانی ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفاتوکسین (*aflR* و *ver1*، *omtA*) در دامنه‌های مختلف شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل و شمارش کپک و مخمرها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در دامنه لگاریتمی ۴/۵- (cfu/gr)

۴ از شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل، ژن‌های *omtA* و *ver1* از بیشترین میزان فراوانی برخوردار می‌باشند (شکل ۲). همانطور که در شکل ۳ مشخص است، بیشترین درصد فراوانی ژن‌های *ver1* و *omtA* در دامنه لگاریتمی ۳/۵-۳/۲ (cfu/gr) از شمارش کپک و مخمرها واقع شده‌اند.



شکل ۲- فراوانی ژن‌های مولد آفاتوکسین در دامنه شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل



شکل ۳: فراوانی ژن‌های مولد آفاتوکسین در دامنه شمارش کپک و مخمر

G₂ را تولید می‌کند (Yu et al. 2004; Xu et al. 2000). قارچ آسپرژیلوس فلاووس با ایجاد اثرات نامطلوب بر سلامت انسان‌ها، بعنوان متداول‌ترین عامل آلوده‌کننده محصولات کشاورزی از جمله بادام زمینی و پسته محسوب می‌گردد.

در تحقیقی که توسط Khodavaissy و همکاران (۲۰۱۲) بر روی نمونه‌های بادام زمینی و پسته خشک صورت گرفت، انواع آسپرژیلوس‌ها به‌عنوان شایع‌ترین عوامل آلودگی شناسایی شدند، بطوری که *A. flavus* بالاترین میزان متوسط آلودگی را در مغزهای پسته و بادام زمینی، به‌ترتیب با $10^3 \times 0.33$ و $10^3 \times 0.29$ cfu/gr ایجاد کرد.

تولید آفلاتوکسین‌ها به‌وسیله فاکتورهای مختلف نظیر ویژگی‌های ژنتیکی قارچ‌های مولد، دما، رطوبت، ترکیب شیمیایی ماده غذایی و عوامل ضد میکروبی تولید شده به وسیله سایر میکروارگانیسم‌ها و یا سوبستراهای گیاهی قارچ‌های رشته‌ای تحت تاثیر قرار می‌گیرد (علامه و رزاقی، ۱۳۸۰). مغزهای خوراکی از جمله پسته ممکن است در حین برداشت، حمل و نقل و فرآوری دچار آلودگی‌های قارچی شوند، لذا در صورت وجود شرایط دمایی و رطوبت‌نسی مناسب، فعالیت آبی مغز دانه افزایش یافته که منجر به رشد و گسترش قارچ و تولید مایکوتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین‌ها می‌گردد (توکلی‌پور و همکاران، ۱۳۹۱). اگرچه حضور قارچ نمی‌تواند دلیلی بر وجود مایکوتوکسین باشد، اما با رشد کپک احتمال وجود مایکوتوکسین افزایش می‌یابد (فراجی و همکاران، ۱۳۸۹). در این پژوهش نیز نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که در دامنه شمارش کپک و مخمرها، ارتباط معنی‌داری بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* وجود ندارد (جدول ۵).

آفلاتوکسین‌ها بصورت بهینه در دماهای بین ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد تولید می‌شوند و هنگامی که دما به دمای بهینه رشد قارچ‌ها نزدیک می‌شود (۳۷ درجه سانتی‌گراد) تولید آفلاتوکسین کاهش می‌یابد. همچنین رطوبت نسبی هوا باید حداقل ۸۵ درصد و رطوبت دانه نیز حداقل ۸ درصد باشد تا شرایط تولید آفلاتوکسین مهیا گردد (رزاقی ابیانه و همکاران، ۱۳۹۰). Khodavaissy و همکاران گزارش کرده‌اند که بیشترین احتمال پرگنه‌زایی توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس در نمونه‌های بادام زمینی و پسته خشک، در رطوبت نسبی ۵۵ درصد و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد فراهم می‌گردد و بین آلودگی نمونه‌های مذکور توسط گونه *A. flavus* با مقدار بالای رطوبت، رابطه معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$).

بررسی ارتباط بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه رطوبت در پسته خام

بمنظور بررسی وجود رابطه احتمالی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* در دامنه‌های مختلف رطوبت دانه‌های پسته، ضریب همبستگی محاسبه گردید. ضریب همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس با ژن‌های ساختاری *omtA* و *ver1* به‌ترتیب ۰/۹۴۵ و ۰/۹۶۱ بدست آمد (جدول ۴). نتایج نشان داد که بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه رطوبت، رابطه مستقیمی وجود دارد، یعنی با افزایش حضور کپک آسپرژیلوس در نمونه‌های پسته، میزان حضور ژن‌های مذکور نیز افزایش می‌یابد ($p < 0.05$).

بررسی ارتباط بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه شمارش کپک و مخمر در پسته خام برای نشان دادن رابطه بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* بر اساس دامنه‌های مختلف شمارش کپک و مخمر در پسته، ضریب همبستگی محاسبه شد. ضریب همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های ساختاری *omtA* و *ver1* در دامنه شمارش کپک و مخمرها، به‌ترتیب ۰/۳۱۲ و ۰/۴۴۲ محاسبه گردید. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* رابطه معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۵).

بررسی ارتباط بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل در پسته خام جهت بررسی رابطه بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* در دامنه شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل موجود در نمونه‌های پسته، ضریب همبستگی محاسبه گردید. ضریب همبستگی بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* به‌ترتیب ۰/۴۵۴ و ۰/۲۰۴ محاسبه گردید. ارتباط معنی‌داری بین حضور کپک آسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* مشاهده نگردید (جدول ۶).

آلودگی قارچی در دانه‌ها ممکن است طی مراحل مختلف رشد گیاه، زمان برداشت، حمل و نقل و نگهداری بروز نماید و در صورت وجود شرایط مناسب، منجر به رشد و گسترش قارچ در دانه‌ها و متعاقباً تولید مایکوتوکسین‌ها شود (Khodavaissy et al. 2012). آفلاتوکسین‌ها از جمله مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها هستند که عمدتاً توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس بویژه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند (رزاقی و همکاران، ۱۳۹۰). آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین‌های B₁ و B₂ است، درحالی که آسپرژیلوس پارازیتیکوس هر ۴ نوع آفلاتوکسین B₁، B₂، G₁ و

جدول ۳- متغیرهای اندازه‌گیری شده در پسته خام و نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

نمونه	رطوبت (درصد وزنی)	شمارش کلی میکروارگانیسم‌های مزوفیل \log_{10} (cfu/gr)	شمارش کپک و مخمر \log_{10} (cfu/gr)	<i>aflR</i>	<i>OmtA</i>	<i>ver1</i>
۱	۱/۲۴	۲/۶۲۳	۲/۲۵۵	-	-	-
۲	۳/۱۴	۳/۷۹۹	۳/۷۳۲	-	+	-
۳	۳/۱۳۸	۲/۶۹۰	۲/۱۱۳	-	-	-
۴	۶/۵۵۸	۲/۴۹۱	۲/۵۵۶	-	-	-
۵	۳/۵۷۸	۳/۷۱۶	۳/۰۴۱	-	-	-
۶	۳/۷۵۸	۴/۸۲۶	۳/۸۴۵	-	+	-
۷	۴/۳۳۶	۳/۹۲۹	۳/۲۳۰	-	+	+
۸	۴/۰۹۸	۲/۹۱۳	۲/۴۷۷	-	-	-
۹	۳/۴۳۹	۳/۵۴۴	۲/۷۵۵	-	+	-
۱۰	۴/۸	۴/۲۳۰	۳/۹۸۲	-	+	-
۱۱	۳/۸	۲/۹۲۴	۲/۵۵۶	-	-	-
۱۲	۳/۳۸	۲/۴۶۲	۲/۱۴۶	-	-	-
۱۳	۲/۴۷۹	۳/۱۱۳	۲/۹۵۴	-	-	-
۱۴	۳/۰۳۷	۲/۸۴۵	۲/۳۸۰	-	-	-
۱۵	۲/۵۷۷	۳/۸۲۶	۳/۶۹۸	-	-	-
۱۶	۳/۳۵۶	۴/۰۴۱	۳/۲۵۵	-	+	+
۱۷	۳/۵۹۶	۴/۹۵۴	۳/۶۰۲	-	-	-
۱۸	۴/۱۹۶	۴/۱۴۶	۳/۳۸۰	-	+	-
۱۹	۳/۸۳۶	۲/۵۵۶	۲/۳۲۲	-	-	-
۲۰	۳/۶۳۹	۴	۳/۵۰۵	-	-	-
۲۱	۳/۹۹۶	۴/۰۴۱	۲/۶۳۳	-	-	-
۲۲	۳/۶۷۸	۵	۳/۲۳۰	-	+	+
۲۳	۴/۳۰۷	۳/۳۲۲	۲/۹۰۳	-	+	-
۲۴	۴	۴/۹۶۳	۳/۳۴۲	-	+	-
۲۵	۲/۸۶۷	۳/۸۸۰	۳/۸۳۲	-	-	-
۲۶	۳/۳۱	۲/۴۳۱	۲/۲۳۰	-	-	-
۲۷	۳/۶۷۲	۴	۳/۹۳۴	-	+	+
۲۸	۳/۵۵	۳/۱۱۳	۲/۷۷۸	-	-	-
۲۹	۳/۴۱۵	۲/۱۷۶	۲/۰۴۱	-	-	-
۳۰	۳/۰۲	۴/۴۳۱	۳/۹۵۴	-	+	-

جدول ۴- همبستگی بین حضور کپک اسپرزیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه رطوبت

دامنه رطوبت	حضور اسپرزیلوس	حضور ژن <i>omtA</i>	حضور ژن <i>ver1</i>
۱/۱-۲/۱	۰/۰۳۴	۰	۰
۲/۱-۳/۱	۰/۱۳۴	۰/۰۳۴	۰
۳/۱-۴/۱	۰/۵۶۷	۰/۲۶۷	۰/۱
۴/۱-۵/۱	۰/۱۳۴	۰/۱۳۴	۰/۰۳۴
۵/۱-۶/۱	۰	۰	۰
۶/۱-۷/۱	۰/۰۳۴	۰	۰
ضریب		۰/۹۴۵	۰/۹۶۱
کوواریانس		۰/۰۲۱۶۶۸۷	۰/۰۰۸۲۱۷۸۰

جدول ۵- همبستگی بین حضور کپک اسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه شمارش کپک و مخمر

دامنه شمارش کپک و مخمر	حضور اسپرژیلوس	حضور ژن <i>omtA</i>	حضور ژن <i>ver1</i>
۲-۲/۳	۰/۱۶۷	.	.
۲/۳-۲/۶	۰/۱۶۷	.	.
۲/۶-۲/۹	۰/۱	۰/۰۳۴	.
۲/۹-۳/۲	۰/۱	۰/۰۳۴	.
۳/۲-۳/۵	۰/۱۶۷	۰/۱۶۷	۰/۱
۳/۵-۳/۸	۰/۱۳۴	۰/۰۳۴	.
۳/۸-۴/۱	۰/۱۶۷	۱/۱۳۴	۰/۰۳۴
ضریب همبستگی		۰/۳۱۲	۰/۴۴۲
کوواریانس		۰/۰۰۰۶۵۶۰۷	۰/۰۰۰۵۳۲۸۱

جدول ۶- همبستگی بین حضور کپک اسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* براساس دامنه شمارش کلی میکروارگانسیم‌های مزوفیل

دامنه شمارش کلی میکروارگانسیم‌ها	حضور اسپرژیلوس	حضور ژن <i>omtA</i>	حضور ژن <i>ver1</i>
۲-۲/۵	۰/۱۳۴	.	.
۲/۵-۳	۰/۲	.	.
۳-۳/۵	۰/۱	.	.
۳/۵-۴	۰/۲	۰/۱	۰/۰۳۴
۴-۴/۵	۰/۲	۰/۱۶۷	۰/۰۶۷
۴/۵-۵	۰/۱۳۴	۰/۰۶۷	.
۵-۵/۵	۰/۰۳۴	۰/۰۳۴	۰/۰۳۴
ضریب همبستگی		۰/۴۵۴	۰/۲۰۴
کوواریانس		۰/۰۰۱۸۰۹۵۷	۰/۰۰۰۳۳۸۶۲

درک ارتباط این فاکتورهای محیطی با بیوسنتز آفاتوکسین به‌عنوان یک امر مهم در تعیین نقش آفاتوکسین در اکولوژی قارچ مولد سم ضروری است و می‌تواند به شناسایی مکان‌های هدف برای کنترل تولید آفاتوکسین کمک کند (رزاقی و همکاران، ۱۳۹۰). چندین مطالعه در خصوص تاثیر شرایط محیطی بر روی میزان رشد قارچ‌ها و بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آفاتوکسین انجام شده است، بطوری‌که تاثیر دو متغیر فعالیت آبی و دما بر روی بیان این ژن‌ها، میزان رشد و تولید آفاتوکسین توسط دو گونه *A. flavus* و *A. parasiticus* نشان داده شده است (Schmidt-Heydt et al., 2010 and 2011). Abdel-Hadi و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که طی نگهداری دانه‌های بادام زمینی در سطوح مختلفی از aw، همبستگی مطلوبی بین بیان ژن ساختاری *aflD* (*nor1*) و تولید آفاتوکسین B₁ توسط قارچ اسپرژیلوس فلاووس وجود دارد بطوری‌که، بهینه برای بیان ژن *aflD* در طول ۲-۳ هفته اول ذخیره‌سازی دانه‌های بادام زمینی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، برابر با ۰/۹ می‌باشد. در تحقیق دیگری Schmidt-Heydt و همکاران

(۲۰۰۸) اثر دما، pH و رطوبت نسبی را بر روی بیان چند ژن دخیل در بیوسنتز مایکوتوکسین چند گونه قارچی بانضمام دسته ژنی آفاتوکسین در اسپرژیلوس پارازیتیکوس مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که شرایط استرسی حدواسط برای این ارگانسیم مطلوب‌ترین وضعیت برای تولید مایکوتوکسین را بوجود می‌آورد. در این پژوهش نتایج بررسی‌های آماری، ارتباط منطقی و معنی داری را میان حضور کپک اسپرژیلوس و ژن‌های *omtA* و *ver1* بر اساس دامنه رطوبت در نمونه‌های پسته خام نشان داد ($p < 0.05$). اما با توجه به اینکه عوامل دیگری مانند دما، pH و ترکیب شیمیایی دانه پسته می‌توانند در حضور کپک اسپرژیلوس و همچنین بیان ژن‌های مولد آفاتوکسین موثر باشند، لذا باید ارتباط این عوامل نیز با میزان حضور کپک اسپرژیلوس و ژن‌های دخیل در مسیر تولید آفاتوکسین بررسی شود.

- Abdel-Hadi, A., Carter, D., Magan, N., 2010, Temporal monitoring of the nor-1 (aflD) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B1 production during storage of peanuts under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1914-1922.
- Allameh, A., Razzaghi-Abyaneh, M., 1999, Mycotoxins, EmamHossein University, Tehran.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., Keller, N. P., 2002, Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459.
- Chen, R.S., Tsay, J.G., Hung, Y.-F., Chion, R.Y.-Y., 2002, Polymerase chain reaction-mediated characterization of molds belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *Aspergillus parasiticus* in peanut kernels by a multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65, 840-844.
- Criseo, G., Bagnara, A., Bisignano, G., 2001, Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 291-295.
- Diener, U. L. and Davis, N. D., 1967, Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44(1967), 259-263.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Erami, M., Saffari, M., Pourbakhsh, S. A., Hashemi, S. J., 2011, Detecting the participating genes in aflatoxin production in suspected eggs for their primary screening, *Arak Medical University Journal (AMUJ)*, 14(55): 1-9.
- European Commission (EC), 2010, amending regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, L50, 8-12.
- FAOSTAT., 2012, FAO Production, Consumption, Resources Statistics [on-line]. FAO.
- Faraji, H., Tabatabayi-Yazdi, F., Kafilzadeh, F., Nasiri-Mahalati, M., 2000, Investigation of total aflatoxins in consumed rice at Mashhad city in the summer and winter, *Journal of Food Science and Technology*, 2(2): 11-16.
- Geisen, R., 1996, Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 388-392.
- Gourama, H. and Bullerman, L., 1995, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food Protection*, 58, 1395-1404.
- Iranian National Standardization Organization, 2013, Pistachio kernel Specifications and test methods, 5th. Revision, 218.
- Iranian National Standardization Organization, 2007, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony- count technique at 30 c, 1st.Revision, 5272.
- Iranian National Standardization Organization, 2008, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and molds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95, 1st. edition, 10899-2.
- Iranian National Standardization Organization, 2010, Food stuffs- Method of sampling of tree nuts, peanuts, other oilseeds , apricot kernels and derived products for aflatoxin analysis-Code of practice, 1st. Edition, 13534.
- Kabirian H.R., Afshari H., Mohammadi Moghadam M. and Hokmabadi H., 2011, Evaluation of pistachio contamination to *Aspergillus flavus* in Semnan provinc. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2(3), 1-6.
- Khodavaisy, S., Maleki, A., Hossainzade, B., Rezai, S., Ahmadi, F., Validi, A., Rashidi, A., Ghahramani, E., 2012, Occurrence of fungal contamination in pistachio and peanut samples from retail shops in Sanandaj province, Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 6(39), 6781-6784.
- Konietzny, U. and Greiner, R., 2003, The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 283-300.
- NajafiKahaki, A., 2009, Detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* species producing aflatoxin in pistachio by molecular methods, M.Sc. thesis, Tehran university digital library.
- Melchers, W. J., verweij, P. E., Van den Hurk, P., Van Belkum, A., De Pauw, B. E., Hoogkamp-korstanje, J. A., Meis, J. F., 1994, General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1710-1717.
- Mojtahedi, H., Rabie, C. J., Lubben, A., Steyn, M. & Danesh, D., 1979, Toxic *Aspergillus* from pistachio nuts. *Mycopathologia*, 67, 123-127.
- OBrian, G. R., Georgianna, D. R., Wilkinson, J. R., Yu, J., Abbas, H. K., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., Payne, G. A., 2007, The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*, 99, 232-239.
- Rahimi, P., Sharifnabi, B., & Bahar, M., 2008, Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from pistachio in iran. *Journal of Phytopathology*, 156, 15-20.
- Rahimi, P., SharifNabi, B., Bahar, M., 2007, *Aspergillus* species isolated from pistachio and determination of their aflatoxin production, *Rostaniha*, 8(1): 30-42.

- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M. and Chang, P.-K., 2011, Aflatoxins: Mechanisms of inhibition by antagonistic plants and microorganisms. In: Guevara-Gonzalez, Ramon G. (Ed.), *Aflatoxins: Biochemistry and Molecular Biology*. INTECH Open Access Publisher, 285-304.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Pilehvar-Soltanabadi, Y., Shams-Ghahfarokhi, M., Alinezhad, S., 2011, Aflatoxins: public health and agricultural concerns, *Institute of Applied Science and Technology JahadDaneshgahi*, Tehran, 18-31.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R., 2008, Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284, 142-149.
- Schmidt-Heydt, M., Rufer, C. E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, R., 2010, The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Res.* 26, 241-246.
- Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R. and Magan, N., 2011, Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol production by two *Fusarium* species. *J. Royal Soc. Interface* 8, 117-126.
- Schnerr, H., Vogel, R. F., Niessen, L., 2002, Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 121-125.
- Sedaghat, R., 2011, Constraints in production and marketing of iran's pistachio and the policies concerned: An application of the garret ranking technique. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2(1), 27-30.
- Shapira R., Paster N., Eyal O., Menasherov M., Mett A. and Salomon R., 1996, Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3270-3273.
- Shokraii, E. H. and Esen, A., 1988, Composition, solubility, and electrophoretic patterns of proteins isolated from kerman pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 425-429.
- Simsek, O., Arici, M. and Demir, C., 2002, Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*. *Nahrung* 46(3), 194-196.
- Suanthie, Y., Cousin, M. A., Woloshuk, C. P., 2009, Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of stored products research*, 45, 139-145.
- Trail, F., Mahanti, N. and Linz, J., 1995, Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology*, 141, 755-765.
- Tavakolipour, H., Javanmard, M., Zirjany, L., 2012, Antiaflatoxigenic activity of pistachio kernel coated by whey protein based edible film incorporated with *zataria multiflora* essential oil, *Journal of Food Science and Technology*, 36(9): 11-19.
- Vyzantiadis, T-A. A., Johnson, E. M., Kibbler, C. C., 2012, From the patient to the clinical mycology laboratory; how can we optimize microscopy and culture methods for mould identification. *Journal of Clinical Pathology*, 65, 475-483.
- Wen, Y., Hatabayashi, H., Arai, H., Kitamoto, H. and Yabe, K., 2004, Function of the *cypX* and *moxY* genes in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 3192-3198.
- Xu, H. X., Annis, S., Linz, J. and Trail, F., 2000, Infection and colonization of peanut pods by *Aspergillus parasiticus* and the expression of the aflatoxin biosynthetic gene, *nor-1*, in infection hyphae. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(5), 185-196.
- Yu, J., Chang, P.-K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P. and Bennett, J. W., 2004, Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1253-1262.

A molecular method for identification of aflatoxigenic fungi in pistachio of Khorasan region (Gonabad and Feyzabad)

N. Pourebrahim¹, M. Yavarmanesh^{*2}

Received: 2014.12.24

Accepted: 2016.04.04

Introduction: Pistachio nut is one of the popular tree nuts. Among the different species of the genus *Pistacia*, only the fruits of *Pistacia vera* attain optimal size to be acceptable to consumers as edible nuts. Contamination of pistachio by *Aspergillus* species and their mycotoxins is the most important problem for consumption and export of this product. Aflatoxins are potent toxic, carcinogenic and mutagenic secondary metabolites primarily produced by two fungal species, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Aspergillus flavus* produces AFB₁ and AFB₂, while *Aspergillus parasiticus* produces AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂. Among four main groups of aflatoxins, AFB₁ is the most potent carcinogenic compound. Therefore, identification of toxigenic fungi is necessary for evaluating the foods quality and the presence of mycotoxins. The current methods being used for assessing fungi presence in foods based on cultivation methods and microscopic characteristics are time-consuming and labor-intensive. Recently, molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) due to high sensitivity, specificity and rapidity has been introduced as powerful tools for detecting toxigenic fungi. Many genes involved in the biosynthesis of these mycotoxins have been identified and their DNA sequences have been published. PCR methods can be used to detect of aflatoxigenic *Aspergilli* based on structural genes (*nor1*, *ver1* and *omtA*) encoding key enzymes in aflatoxin biosynthesis pathway and the regulatory gene *aflR*.

Materials and method: Pistachio samples were collected from different cultivation regions of two towns including Gonabad and Feyzabad. Samples were packed in sterile plastic bags and immediately transferred to the laboratory. The moisture content of samples was determined using thermal method and drying in at 95-100°C. Among fungal isolates 30 *Aspergillus* genus were detected and purified by cultural-based methods using PDA (potato dextrose agar) medium. Colonies of the fungus were transferred to PDB (potato dextrose broth) medium and incubated for 5 days at 28°C with shaking at 150 rpm. The mycelium was frozen in liquid nitrogen and ground to a powder for later DNA isolation. DNA was extracted with CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) extraction buffer, then was purified with organic solvents such as chloroform/isoamyl alcohol and finally was precipitated by isopropanol. *Aspergillus* genus were detected using polymerase chain reaction by specific primer pair Asp1/Asp2 for amplification of 18S rRNA region. Furthermore, aflatoxigenic genes were detected by three sets of primers (APA-450/APA-1482, *ver1/ver2* and OMT-208/OMT-1232). PCR was performed in a volume of 25 µl containing 0.5 µl of each primer, 12.5 µl of Taq DNA polymerase master mix red, 10.5 µl of sterile distilled water and 1 µl of genomic DNA as template. A PCR consisted of an initial denaturing step of 5 min at 94°C followed by 35 cycles (30 s at 94°C, 35 s at 65°C and 40 s at 72°C) finished by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel in TBE.

Results and Discussion: Among fungal isolates 30 *Aspergillus* genus were detected using microscopic characteristics and colony color. Under the microscope, conidia were one-celled, spherical, hyaline or pigmented and they formed long chains. 12 and 4 out of 30 samples had *omtA* and *ver1* genes respectively. No observation was found for *aflR* regulatory gene in the fungal isolates. The results showed that although some isolates had one or two structural genes in the aflatoxin biosynthetic pathway, they could not produce aflatoxin due to not having any *aflR* gene. Coefficient of correlation was calculated to find the relationship between the existence of *Aspergillus* molds and aflatoxigenic genes in pistachio. The statistical results indicated that there is a significant

1- Former MSc Student, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(*Corresponding Author E-Mail Address: yavarmanesh@um.ac.ir)

correlation between the enumeration of *Aspergillus* molds and the existence of genes (*omtA* and *ver1*) in different moisture domains ($p < 0.05$) while no significant correlation was identified between the enumeration of *Aspergillus* molds and the existence of genes in different domains of enumeration of mesophilic bacteria, yeasts and molds. Contamination of nut seeds by fungi occurs during growth, harvesting, transport and storage. The production of aflatoxin is affected by different factors, such as genetic properties of the producing fungi, temperature, moisture content, the chemical composition of food and antimicrobial agents produced by other microorganisms. Water stress and temperature are the most relevant environmental factors which influence fungal growth and mycotoxin production. Other studies showed that there was a good correlation between the expression of an early structural gene (*afID*) and aflatoxin B₁ production in peanut seeds. Also previous studies have shown that there was a significant relationship between *A. flavus* contamination in the peanuts and pistachio with high humidity ($p < 0.05$). Since other factors such as temperature, pH and chemical composition of pistachio can affect the existence of *Aspergillus* molds and expression of aflatoxigenic genes, the influence of these factors on existence of *Aspergillus* molds and genes involved in aflatoxin biosynthesis pathway need to be investigated.

Keywords: *Aspergillus*, Aflatoxin, Pistachio, Aflatoxigenic genes, Polymerase chain reaction

بررسی ویژگی‌های رئولوژیکی و حسی موس شکلاتی حاوی سدیم کازئینات و ژلاتین

سعید میرعرب رضی^۱، محبت مجبی^{۲*}، محمدحسین حداد خداپرست^۳، آرش کوچکی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۲۸

چکیده

در این پژوهش اثر مقادیر مختلف ژلاتین (۱، ۲ و ۳ گرم) و سدیم کازئینات (۱، ۲ و ۳ گرم) بر ویژگی‌های حسی و رئولوژیکی نمونه‌های موس شکلاتی بررسی شد. همچنین از روش تجزیه به مولفه‌های اصلی جهت تعیین روابط پارامترهای حسی و بدست آوردن مولفه‌های اصلی استفاده گردید. مشاهدات نشان داد نمونه موس شکلاتی حاوی دو گرم ژلاتین و سه گرم سدیم کازئینات بهترین ویژگی‌های حسی را داشت. نتایج حاصل از برآزش داده نشان داد که مدل پاورلا با داشتن R^2 بالا (۰/۹۹) و RMSE پایین بهترین مدل جهت توصیف رفتار جریان می‌باشد. ضریب قوام در نمونه‌ای از موس شکلاتی که سه گرم ژلاتین و سه گرم سدیم کازئینات را دارا بود، بیشتر بود. دانسیته نیز با افزایش مقدار پروتئین و کاهش مقدار ژلاتین، کاهش یافت. همچنین با استفاده از روش تجزیه به مولفه‌های اصلی مشخص شد پذیرش کلی نمونه‌ها همبستگی بالایی با نرمی، پوشش دهانی و ژله‌ای بودن داشت.

واژه‌های کلیدی: رئولوژی، ژلاتین، کازئینات سدیم، موس شکلاتی

(and Foegeding, 2007).

مقدمه

با وجود ساختار پیچیده‌ای این عوامل به دلیل سازگاری گروه‌های آب گریز با فاز گازی جذب سطوح بینابینی هوا-آب می‌شوند و با قرارگیری گروه‌های آب دوست به سمت آب و آب گریز به سمت هوا بصورت جزئی دناتورده می‌شوند. پروتئین‌ها کشش بین سطحی را نیز کاهش می‌دهند و می‌توانند با پروتئین‌های اطراف پیوند هیدروژنی، هیدروفوب و حتی کوالانسی برقرار کنند و فیلم‌های منسجمی ایجاد کرده که موجب افزایش پایداری حباب می‌شود (Nicorescu *et al.*, 2011).

در فرمولاسیون موس شکلاتی استفاده از سفیده تخم‌مرغ به عنوان عامل کفزا مرسوم می‌باشد. ولی به دلیل اینکه سفیده بصورت خام در فرمول موس استفاده می‌شود می‌تواند باعث ایجاد مشکلات تغذیه‌ای گردد. پروتئین‌های شیر، نمونه‌ای از پروتئین‌های غذایی هستند که قابلیت کف‌زایی و امولسیفایری مناسبی دارند. کازئینات یکی از انواع پروتئین‌های شیر و در واقع نوع محلول در آب کازئین می‌باشد که مخلوطی از فراکسیون‌های α_s1 ، α_s2 ، β و K است (Abascal and Jesus, 2009). کازئینات و کازئین در مواد غذایی سبب ایجاد ویژگی‌های مختلفی از جمله پیوند با آب و چربی، افزایش ویسکوزیته، کف‌زایی، ایجاد ژل و تولید امولسیون می‌شوند. این پروتئین‌ها در تهیه غلات صبحانه‌ای، غذاهای پخته شده، دسرها

موس^۵ نوعی دسر غذایی بر پایه سیستم کف می‌باشد که بیشتر بصورت خانگی تولید می‌شود، اما امروزه در مقیاس صنعتی نیز قابل تولید است. مطلوب‌ترین طعم موس، شکلاتی است اما طعم‌های پرتقال، لیمو و توت فرنگی آن نیز بازارپسندی مناسبی دارد. تولید صنعتی دسرهای لبنی بر پایه سیستم کف نیاز به دانش شکل‌گیری و پایداری کف‌ها با استفاده از اجزای تشکیل‌دهنده آن دارد (Jesus, 2009).

کف دیسپرسیونی است که در آن فاز گازی در فاز پیوسته (مایع یا جامد) پراکنده شده و شکل‌گیری آن نیازمند حضور عوامل فعال سطحی می‌باشد. پروتئین‌ها به دلیل توانایی جذب در سطوح بینابینی هوا-مایع و کاهش کشش بین سطحی بعنوان عوامل کف‌زا شناخته می‌شوند (Nicorescu *et al.*, 2011)، که در حین یا بعد از جذب اولیه این ترکیبات، پیوند پروتئین-پروتئین در سطوح بینابینی می‌تواند منجر به تشکیل شبکه‌ای گردد که باعث پایداری حباب شود (Davis

۱ و ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳ و ۵- استادن گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
* - نویسنده مسئول: (Email: mohebbatm@gmail.com)

شکلاتی نشان داده شده است. جهت تولید موس، ابتدا پودر کاکائو و شکر در آب داغ (در حال جوش) حل شدند و به خامه که به مدت ۳ دقیقه با همزن خانگی (گوسونیک، ۵۴۰۰ دور بر ثانیه) زده شده بود، افزوده شدند. سدیم کازئینات پس از اینکه به وسیله همزن مغناطیسی حل شد به مدت ۲ دقیقه زده و به مخلوط اضافه گردید. ژلاتین نیز پس از اینکه در آب با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حل شد در پایان به موس افزوده شده، محصول نهایی در بسته‌ی پلاستیکی به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد.

اندازه‌گیری دانسیته

جهت تعیین دانسیته، مقداری از موس بلافاصله بعد از تولید به استوانه مدرج انتقال داده شده، وزن آن اندازه‌گیری شد، سپس دانسیته آن از رابطه ۱ به دست آمد (Haedelt et al., 2007):

$$(1) \quad \text{حجم ظرف (cm}^3\text{)} / \text{وزن موس شکلات (گرم)} = \text{دانسیته}$$

پارامترهای رئولوژیکی

خصوصیات رئولوژیکی مخلوط موس شکلاتی با استفاده از ویسکومتر چرخشی بوهلین (Bohlin Model, Visco 88, UK) مجهز به سیرکولاتور حرارتی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید. برای هر آزمون مقدار 15 ± 3 گرم نمونه به درون کاپ منتقل شد و نمونه‌ها جهت رسیدن به ثبات حرارتی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه نگهداشته شدند. اسپیندل (C_{30}) بر اساس ویسکوزیته مخلوط انتخاب شد. نمونه‌ها ابتدا تحت درجه برشی اولیه $14/1 \text{ s}^{-1}$ به مدت ۱۰-۱۵ ثانیه قرار گرفتند، سپس دامنه مشخصی از درجه برشی ($14/1$ تا 300 بر ثانیه) بر آن‌ها اعمال شد. بمنظور مدل‌سازی خواص جریان موس شکلاتی و توصیف داده‌های رئولوژیکی از مدل‌های متداول که جهت مطالعات جریان مستقل از زمان کاربرد دارند، شامل مدل‌های هرشل بالکی (۲)، بینگهام (۳)، پاورلا (۴) و کاسون (۵) استفاده شد. با استفاده از آنالیز آماری، مناسب‌ترین مدل ریاضی بر اساس شاخص‌های ضریب تبیین (R^2) و میانگین مجذورات خطا (RMSE) انتخاب شد.

$$(2) \quad \tau = \tau_0 + k(\dot{\gamma}^0)^n$$

$$(3) \quad \tau = \tau_0 + \eta_p(\dot{\gamma}^0)^n$$

$$(4) \quad \tau = k(\dot{\gamma}^0)^n$$

$$(5) \quad \tau^{0.5} = \tau_0^{0.5} + \eta_{p1}(\dot{\gamma}^0)^{0.5}$$

که در این معادلات، τ ، تنش برشی (pa)، Y_0 ، سرعت برشی (s^{-1})، τ_0 تنش تسلیم (pa)، η_p ویسکوزیته پلاستیک (pa.s)، η_{p1} ویسکوزیته کاسون (pa.s)، n اندیس رفتار جریان، k ضریب قوام (pa.s) است (Mohammadi moghaddamm et al., 2009).

و محصولات زده شده^۱ کاربرد دارند. سدیم کازئینات بعنوان نمک کازئین، دارای عطر و طعم مطبوع با ظرفیت نگهداری آب مناسب و حلالیت بالا در آب می‌باشد (Morr et al., 2012).

در میان هیدروکلوئیدهایی که در صنعت غذا استفاده می‌شود ژلاتین به دلیل خصوصیات مطلوب کاربرد زیادی دارد. ویژگی‌های کاربردی ژلاتین را می‌توان به دو گروه تقسیم‌بندی کرد. گروه اول مربوط به تولید ژل (مانند قدرت ژل، زمان تشکیل ژل، دمای تشکیل، ذوب، ویسکوزیته، غلیظ‌کنندگی، و باند شدن با آب) می‌باشد و گروه دوم بر اساس رفتار سطحی ژلاتین (مانند تشکیل، پایداری امولسیون، تشکیل و پایداری کف) بیان می‌شوند.

از جمله خواص ویژه ژلاتین در صنعت غذا می‌توان به ذوب شدن در دهان، ژل‌های برگشت‌پذیر، فعالیت سطحی، سادگی استفاده و خصوصیات کاربردی زیاد مانند تولید ژل، غلیظ‌کنندگی، باند شدن با آب، تشکیل کف و تشکیل فیلم نام برد.

روش PCA^۲ یا تجزیه به مولفه‌های اصلی تکنیکی مفید جهت ارزیابی داده‌ها می‌باشد که محققان زیادی از این روش در تحلیل نتایج ارزیابی حسی استفاده کرده‌اند. در حقیقت کاربرد این روش برای تعداد زیادی متغیر اندازه‌گیری شده است که برخی از آن‌ها به هم بستگی داشته، در نتیجه موجب بروز خطا در تحلیل آن‌ها می‌شود. بنابراین با این روش تعداد متغیر اصلی کاهش یافته، تعداد کمتری متغیر مصنوعی (تحت عنوان مولفه‌های اصلی) بدست می‌آید که بیشترین واریانس متغیرهای مشاهده شده را دربردارند (یگانه زاد، ۱۳۹۱).

در این پژوهش از مقادیر مختلف ژلاتین و سدیم کازئینات جهت تولید موس شکلاتی استفاده شد. از این رو هدف از انجام این پژوهش تعیین مقدار مناسب پروتئین و ژلاتین در ساختار موس بود، به نحوی که نمونه‌ها از پذیرش مناسبی برخوردار گردند. هدف دیگر تعیین ضریب همبستگی بین پارامترهای حسی بود، به نحوی که فاکتورهایی که بیشترین تاثیر را در پذیرش کلی داشتند، مشخص گردیدند.

مواد و روش

مواد

در این تحقیق از سدیم کازئینات (۷۷ درصد پروتئین، شرکت میلاد، تهران، ایران)، ژلاتین (نوع B، بلوم ۱۶۰-۱۸۰، بنگلادش)، شکر (فریمان، مشهد، ایران)، پودر کاکائو (کارگیل، هلند)، خامه زده شده (ماهرنگ سحر شرق، ۲۷٪ چربی، مشهد، ایران) بعنوان مواد اولیه استفاده شد. در جدول ۱ فرمولاسیون‌های مختلف موس

1 Whipped Product

2 Principal Component Analysis

ارزیابی حسی

جهت انجام آزمون حسی نمونه‌های موس شکلاتی، ۱۱ ارزیاب در محدوده سنی ۳۰-۲۳ سال (۶ مرد و ۵ زن) در آزمون شرکت کردند. پس از اینکه نمونه‌های موس شکلاتی به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد، ویژگی‌های مختلف آن توسط آزمون هدونیک نقطه‌ای (۱=بی‌نهایت ناخوشایند، ۲= بسیار ناخوشایند، ۳=متوسط ناخوشایند، ۴= کم ناخوشایند، ۵= متوسط، ۶= کم خوشایند، ۷= متوسط خوشایند، ۸= بسیار خوشایند، ۹=بی‌نهایت خوشایند) مورد ارزیابی قرار گرفت (یگانه زاد، ۱۳۹۱). جهت درک بهتر مفاهیم برای هر پارامتر تعاریفی در نظر گرفته شد (عطر و طعم کاکائو، میزان دریافت عطر و طعم ناشی از پودر کاکائو؛ شیرینی، مقدار احساس شیرینی مرتبط با ساکارز؛ نرمی، مقدار نرمی حس شده در دهان که وابسته به حضور و عدم حضور حباب بزرگ است؛ تخلخل، میزان هوای حس شده در دهان؛ ماسیدگی، مرتبط با دانسیته و سفتی؛ ژلی بودن، مرتبط با بافت ژلی ناشی از ژلاتین؛ پودری، مرتبط با حس کردن حالت پودری در دهان که بیشتر مرتبط با پودر کاکائو می‌باشد؛

سرعت ذوب، مرتبط با سرعت ذوب شدن نمونه در دهان می‌باشد؛ روغنی بودن، مرتبط با حس کردن حالت چرب در دهان است؛ ظاهر، مرتبط با یکنواختی حفرات؛ رنگ، مرتبط با مقدار تیرگی رنگ ناشی از پودر کاکائو؛ پذیرش کلی، میزان پذیرش بدست آمده با توجه به تمامی پارامترهای ذکر شده) (Kilcast and Clegg, 2002).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از طرح آماری کاملاً تصادفی (CRD) در قالب فاکتوریل و با سه تکرار استفاده و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. نتایج در معرض آنالیز واریانس قرار گرفته و میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح آماری ۹۵ درصد مقایسه شدند. از نرم افزار Matlab(R2011a) برای برآزش مدل‌های رنولژیکی استفاده شد. همچنین از روش تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ جهت بدست آوردن مولفه‌های اصلی و ارتباط پارامترهای حسی، ویسکوزیته و دانسیته استفاده گردید...

جدول ۱- فرمولاسیون استفاده شده در تولید موس شکلاتی (برحسب گرم)

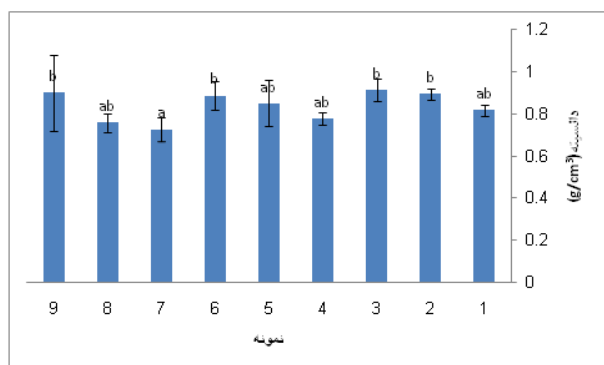
مواد اولیه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
پودر کاکائو	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶	۶
خامه زده شده	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰
سدیم کازئینات	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۳	۳	۳
ژلاتین	۱	۲	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳
شکر	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲
آب مقطر	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵

می‌شود. Pernell و همکاران (۲۰۰۲) نیز به همین نتایج دست یافتند.

نتایج و بحث

دانسیته

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، میزان دانسیته در نمونه‌های مختلف موس شکلاتی متفاوت بود. کمترین دانسیته مربوط به نمونه ۷ (۳ گرم سدیم کازئینات و ۱ گرم ژلاتین) با بیشترین میزان پروتئین و کمترین مقدار ژلاتین بود. بطور کلی با افزایش مقدار هیدروکلئیدها در فرمولاسیون موس، ویسکوزیته افزایش می‌یابد که این افزایش ویسکوزیته مانع ورود هوای بیشتر به درون مخلوط شده، در نتیجه دانسیته افزایش می‌یابد. پروتئین‌ها نیز به دلیل خاصیت کف‌زایی می‌توانند باعث کاهش دانسیته شوند. Haedelt و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که در شکلات‌هایی که هوادهی کمتری داشت، میزان نگهداری گاز کاهش و در نتیجه دانسیته افزایش می‌یافت. Indrawati و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزایش غلظت پروتئین منجر به افزایش سرعت جذب در سطوح بینابینی هوا-مایع و در نتیجه کاهش کشش سطحی و افزایش قابلیت کف‌زایی



شکل ۱- مقایسه دانسیته در نمونه‌های مختلف موس شکلاتی (p<0.05)

تأثیر کازئینات سدیم و ژلاتین بر برخی ویژگی‌های رئولوژیکی در جدول ۲ ضریب تبیین و میانگین مجزورات خطا در نمونه‌های

ویسکوزیته ژل افزایش یافت.

ارزیابی حسی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های مربوط به آزمون حسی در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان عطر و طعم و شیرینی در نمونه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) نداشت. اما علاقه ارزیابان حسی به نرمی در نمونه‌های ۲ (۱ گرم سدیم کازئینات و ۲ گرم ژلاتین) و ۸ (۳ گرم سدیم کازئینات و ۲ گرم ژلاتین) بیشتر بود. کمترین مقدار نرمی نیز مربوط به نمونه ۹ (۳ گرم سدیم کازئینات و ۳ گرم ژلاتین) بود. میزان تخلخل و ماسیدگی در نمونه‌های مختلف متفاوت بود. ارزیابان حسی نمونه ۸ را از لحاظ این دو ویژگی مناسب بیان نمودند. ارزیابان حسی حالت ژلی نمونه‌های ۲، ۵ (۲ گرم سدیم کازئینات و ۲ گرم ژلاتین) و ۸ را مناسب بیان کردند. پودری، روغنی بودن، ظاهر و رنگ در نمونه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) نداشت. سرعت ذوب در نمونه‌های ۵ و ۸ بهترین حالت را دارا بود. پوشش دهانی نیز در نمونه‌های ۲، ۵ و ۸ از مقدار مناسب‌تری برخوردار بود. میزان پذیرش کلی نمونه‌های ۵ و ۸ بیشتر از سایر نمونه‌ها بود. بطور کلی پذیرش کلی وابسته به میزان ژلاتین بود. ارزیابان حسی نمونه‌های دارای ژلاتین متوسط را بیشتر پسندیدند.

مختلف موس شکلاتی نشان داده شده است. هر چند که در نمونه‌های مختلف مدل هرشل بالکلی بالاترین مقدار R^2 و کمترین مقدار RMSE را دارا بود زیرا تنش تسلیم در این مدل منفی بود که نشانه‌ای از ناکارآمد بودن این مدل می‌باشد (عمادزاده، ۱۳۸۹). از این رو مدل پاورلا به دلیل مقادیر مناسب R^2 و RMSE بعنوان بهترین مدل انتخاب شد. نیز به دلیل وجود مقادیر تنش تسلیم در رفتار جریان نمونه‌های کره پسته کم‌کالری این مدل را نامناسب ارزیابی کرد.

تناسب این مدل برای محصولات مشابه از جمله بستنی توسط بهرام پرور و همکاران (۲۰۱۰)، ماست توسط Abu-Jdayil و Mohameed (۲۰۰۲) و خمیر یک توسط Sakiyan و همکاران (۲۰۰۴) مورد تأیید قرار گرفته است.

در جدول ۳ نتایج مربوط به رفتار جریان و ضریب قوام در نمونه‌های موس شکلاتی نشان داده شده است. بطور کلی ضریب قوام در نمونه‌های مختلف، با افزایش مقدار ژلاتین و پروتئین افزایش یافت. بیشترین مقدار ضریب قوام مربوط به نمونه ۹ (۳ گرم ژلاتین و ۳ گرم سدیم کازئینات) بود که بیشترین مقدار ژلاتین و پروتئین را دارا بود. کمترین ضریب قوام نیز مربوط به نمونه ۱ (۱ گرم ژلاتین و ۱ گرم سدیم کازئینات) بود. با افزایش مقدار ژلاتین به دلیل افزایش تعداد مولکول‌های با وزن مولکولی بالا در فاز مایع و در نتیجه افزایش مقاومت در برابر جریان، مقدار ضریب قوام افزایش می‌یابد. Schrieber (۱۹۷۶) نیز گزارش کرد که با افزایش غلظت ژلاتین

جدول ۲- ضریب تبیین و میانگین مجذورات خطا در نمونه‌های مختلف

	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
پاورلا	۰/۹۹۹۵	۰/۹۹۹۱	۰/۹۹۳۸	۰/۹۹۵۷	۰/۹۹۶۸	۰/۹۹۶۴	۰/۹۹۷۶	۰/۹۹۰۱	۰/۹۹۶۱	R^2
	۰/۸۰۳	۰/۶۰۹	۰/۸۲	۱/۶۱	۰/۷۶۴	۰/۶۰۸	۰/۹۶	۰/۹۲۵	۰/۳۸۴	RMSE
بینگهام	۰/۹۹۲۶	۰/۹۸۹	۰/۹۷۸	۰/۹۸	۰/۹۷۹۲	۰/۹۸۵۹	۰/۹۸۵۴	۰/۹۷۷	۰/۹۸۲۹	R^2
	۲/۸۶۵	۲/۴۱	۱/۵۸	۳/۴۸	۲	۱/۱۷۹	۲/۱۷۵	۱/۷۳	۰/۹۰۲	RMSE
هرشل بالکلی	۰/۹۹۹۷	۰/۹۹۹۴	۰/۹۹۵۵	۰/۹۹۸۷	۰/۹۹۸۹	۰/۹۹۷۲	۰/۹۹۸۵	۰/۹۹۱۴	۰/۹۹۸۳	R^2
	۰/۵۸۵	۰/۴۲۶	۰/۷۴۸	۰/۹۲۱	۰/۴۶۳	۰/۵۵۶	۰/۶۹۳	۰/۸۵۳	۰/۲۷۷	RMSE
کاسون	۰/۹۹۷۳	۰/۹۹۵۵	۰/۹۸۸	۰/۹۸۹۵	۰/۹۹۱۳	۰/۹۹۰۹	۰/۹۹۳۱	۰/۹۸۵۹	۰/۹۹۱۱	R^2
	۱/۷۶۷	۱/۴۰۴	۱/۰۹	۲/۵۳	۱/۲۵۲	۱/۰۴۷	۱/۳۷۵	۱/۲۵	۰/۶۳	RMSE

جدول ۳- شاخص توان و ضریب قوام در نمونه‌های موس شکلاتی

	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
	۳/۱۹±۱/۰۴ ^b	۰/۲۴±۰/۲۱ ^{ab}	۲/۰۳±۰/۸۷ ^{ab}	۱/۷۷±۰/۲۷ ^{ab}	۲/۰۴۵±۰/۴۲ ^{ab}	۱/۳۹±۰/۴۲ ^{ab}	۲/۳۲±۰/۲۵ ^{ab}	۱/۹±۰/۷۵ ^{ab}	۰/۵۸±۰/۱۶ ^a	K (pa.s)
	۰/۶۹۸	۰/۶۴۱	۰/۶۲۶	۰/۷۰۲	۰/۵۸۸	۰/۶۲۴	۰/۷۲۲	۰/۶۱۷	۰/۶۹۸	n

اعداد با حروف لاتین مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد ندارند

جدول ۴- مقایسه میانگین ویژگی‌های حسی در نمونه‌های مختلف موس شکلاتی

نمونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
عطرو طعم	۷/۳±۰/۶۷ ^a	۷/۱±۱/۱ ^a	۷/۱±۰/۷۳ ^a	۷/۲±۱/۰۳ ^a	۷/۳±۰/۹۴ ^a	۷/۱±۰/۷۳ ^a	۷/۲±۰/۷۸ ^a	۷/۲±۰/۹۱ ^a	۶/۹±۰/۵۶ ^a
شیرینی	۶/۶±۱/۸۹ ^a	۶/۵±۱/۵ ^a	۷±۱/۰۵ ^a	۶/۸±۱/۵۴ ^a	۶/۸±۱/۶۱ ^a	۷/۲±۰/۶۳ ^a	۶/۸±۱/۶۱ ^a	۷/۳±۱/۲۵ ^a	۷±۰/۶۶ ^a
نرمی	۶/۹±۱/۴۴ ^c	۷/۲±۱/۴۷ ^{cd}	۷/۲±۰/۶۳ ^{abc}	۶/۸±۱/۳۹ ^{bc}	۷±۰/۶۶ ^c	۷/۸±۰/۹۱ ^{ab}	۶/۹±۰/۸۷ ^c	۸/۱±۰/۷۳ ^d	۵/۴±۱/۲۶ ^a
تخلخل	۵/۹±۱/۷۹ ^a	۷±۱/۴۹ ^{ab}	۷/۷±۰/۹۴ ^{ab}	۶/۴±۱/۰۷ ^a	۷/۲±۱/۴۷ ^{ab}	۷±۱/۰۵ ^{ab}	۷±۱/۲۴ ^{ab}	۷/۸±۰/۹۱ ^b	۶/۳±۱/۲۵ ^a
ماسیدگی ^۱	۶/۷±۱/۱۵ ^{ab}	۶/۷±۱/۱۵ ^{ab}	۷±۰/۸۷ ^{ab}	۷±۱/۴۱ ^{ab}	۶/۹±۱/۳۷ ^{ab}	۶/۳±۱/۱۵ ^a	۶/۹±۱/۲۸ ^{ab}	۷/۶±۰/۶۹ ^b	۵/۸±۱/۲۲ ^a
حالت زلی	۵/۷±۱/۶۳ ^{ab}	۶/۸±۱ ^{bc}	۶±۱/۴۱ ^{abc}	۶±۱/۱۵ ^{abc}	۶/۸±۱/۴۷ ^{bc}	۵/۳±۰/۸۲ ^a	۶/۲±۱/۳۹ ^{abc}	۷/۴±۱/۳۴ ^c	۵/۲±۱/۶۱ ^a
پودری	۷/۵±۱/۳۵ ^a	۶/۶±۱/۱۷ ^a	۷/۲±۰/۶۳ ^a	۷/۵±۱/۲۶ ^a	۶/۸±۱/۳۱ ^a	۶/۹±۰/۹۹ ^a	۶/۷±۱/۴۱ ^a	۷/۲±۱/۵۴ ^a	۶/۲±۱/۴۷ ^a
سرعت ذوب	۶/۶±۰/۹۶ ^{bc}	۷±۰/۶۶ ^{bc}	۵/۹±۱/۲۸ ^{ab}	۶/۹±۱/۱۹ ^{bc}	۷/۱±۰/۹۹ ^c	۵±۱/۲۴ ^a	۷±۰/۸۱ ^{bc}	۷/۳±۰/۹۴ ^c	۴/۹±۱/۶۶ ^a
روغنی بودن	۶/۴±۱/۵۷ ^a	۶/۴±۱/۱۷ ^a	۷/۱±۰/۹۹ ^a	۷/۱±۱/۵۲ ^a	۷/۴±۱/۳۴ ^a	۶/۴±۱/۲۶ ^a	۶/۹±۰/۹۹ ^a	۷/۴±۰/۶۹ ^a	۶/۲±۱/۳۱ ^a
پوشش دهانی	۶/۴±۱/۵ ^{abc}	۷/۳±۰/۹۴ ^c	۷/۳±۰/۸۷ ^{abc}	۶/۸±۱/۲۲ ^{abc}	۷/۴±۰/۶۹ ^c	۶±۱/۲۴ ^{ab}	۷/۱±۰/۵۶ ^{bc}	۷/۵±۱/۰۸ ^c	۵/۹±۱/۵۹ ^a
ظاهر	۶/۹±۰/۷۳ ^a	۷/۲±۰/۹۱ ^a	۷/۶±۰/۶۹ ^a	۷/۱±۰/۸۷ ^a	۷/۱±۱/۱ ^a	۷/۶±۰/۵۱ ^a	۷/۱±۰/۵۶ ^a	۷/۶±۰/۶۹ ^a	۷±۰/۸۱ ^a
رنگ	۷±۰/۸۱ ^a	۷/۶±۱/۰۷ ^a	۷/۶±۰/۸۴ ^a	۷±۱/۰۵ ^a	۷/۴±۱/۰۷ ^a	۷/۷±۰/۴۸ ^a	۷/۴±۰/۶۹ ^a	۷/۷±۰/۶۷ ^a	۷/۲±۰/۷۸ ^a
پذیرش کلی	۶/۷±۰/۴۸ ^{bc}	۷/۲±۰/۹۱ ^{bcd}	۶/۸±۰/۹۱ ^{bc}	۶/۴±۰/۶۹ ^b	۷/۳±۰/۹۴ ^{cd}	۷/۵±۰/۵۲ ^{bc}	۶/۹±۱/۱ ^{bcd}	۷/۷±۰/۶۷ ^d	۵/۵±۱/۲۶ ^a

اعداد با حروف لاتین مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد ندارند.

جدول ۵- میزان همبستگی پارامترهای حسی

عطرو طعم	شیرینی	نرمی	تخلخل	ماسیدگی	زلی بودن	پودری	سرعت ذوب	روغنی بودن	پوشش دهانی	ظاهر	رنگ	پذیرش کلی	ویسکوزیته	دانسیته
۱	-۰/۲۸۷	-۰/۶۶۹	-۰/۱۳۴	-۰/۶۷۸	-۰/۴۸۵	-۰/۴۵۱	-۰/۷۴۲	-۰/۵۵	-۰/۵۳۷	-۰/۱۵۳	-۰/۱۸۲	-۰/۶۶	-۰/۷۴۱	-۰/۵۶۴
شیرینی	۱	-۰/۱۲۵	-۰/۴۸۷	-۰/۱۰۲	-۰/۱	-۰/۱۳۷	-۰/۳۸۳	-۰/۲۷۷	-۰/۱۶۸	-۰/۷۲۶	-۰/۴۹۷	-۰/۰۹	-۰/۴۶۸	-۰/۰۲۷
نرمی	۱	۱	-۰/۵۴۶	-۰/۸۸۸	-۰/۸۰۵	-۰/۳۱۹	-۰/۹۲۲	-۰/۵۹۴	-۰/۸۵	-۰/۰۷۸	-۰/۱۶۲	-۰/۸۷۴	-۰/۳۴۲	-۰/۰۶۲۵
تخلخل	۱	۱	۱	-۰/۵۶۱	-۰/۴۷۶	-۰/۱۴۴	-۰/۳۷۸	-۰/۵۷۷	-۰/۶۵۵	-۰/۶۲۹	-۰/۸۰۲	-۰/۷۲۴	-۰/۳۴۶	-۰/۰۲۳۵
ماسیدگی	۱	۱	۱	۱	-۰/۸۱۴	-۰/۳۵۸	-۰/۸۳	-۰/۸۲۳	-۰/۸۳۲	-۰/۳۳۳	-۰/۲۲۷	-۰/۱۴۶	-۰/۰۳	-۰/۰۶۲۴
زلی	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۱۷۸	-۰/۸۳۸	-۰/۷۳۷	-۰/۸۱۳	-۰/۰۷۹	-۰/۰۲۶	-۰/۶۳۹	-۰/۱۷	-۰/۰۵۲۱
پودری	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۱۳۵	-۰/۱۲۸	-۰/۱۶۲	-۰/۳۳۸	-۰/۳۲۵	-۰/۵۲	-۰/۳۷	۰
سرعت ذوب	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۶۲۷	-۰/۸۸۷	-۰/۱۶۸	-۰/۰۵۴	-۰/۷۷۹	-۰/۳۸۷	-۰/۰۶۵۵
روغنی بودن	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۷۴۸	-۰/۳۲۲	-۰/۱۹۲	-۰/۶۴۲	-۰/۰۲۹	-۰/۰۴۶۵
پوشش دهانی	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۱۵۵	-۰/۳۲۶	-۰/۸۷۵	-۰/۰۴	-۰/۰۴۱۳
ظاهر	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۸۳۷	-۰/۳۹۶	-۰/۲۵۲	-۰/۱۸۳
رنگ	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۵۱۳	-۰/۳۹۴	-۰/۲۴۱
پذیرش کلی	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۲۵۶	-۰/۰۳۶
ویسکوزیته	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-۰/۳۱۶
دانسیته	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱

عطر و طعم	شیرینی	نرمی	تخلخل	ماسیدگی	ژلی بودن	پودری	سرعت ذوب	روغنی بودن	پوشش دهانی	ظاهر	رنگ	پذیرش کلی	ویسکوزیته	دانسیته
۱	۰.۲۸۷	۰.۶۶	۰.۱۳۴	۰.۶۷۸	۰.۴۸۵	۰.۴۵۱	۰.۷۴۲	۰.۵۵۰	۰.۵۳۷	۰.۱۵۳	۰.۱۸۲	۰.۶۶۰	۷۴۱.	۰.۵۶۴
شیرینی	۰.۲۸۷	۱۲۵.	۰.۴۸۷	۰.۱۰۲	۰.۱۰۰	۰.۱۲۷	۰.۳۸۳	۰.۲۷۷	۰.۱۶۸	۰.۷۲۶	۰.۴۹۷	۰.۰۹-	۴۶۸.	۰.۰۲۷
نرمی	۰.۶۶۹	۰.۱۲۵-	۱	۰.۸۸۸	۰.۸۰۵	۰.۳۱۹	۰.۹۲۲	۰.۵۹۴	۰.۸۵۰	۰.۰۷۸	۰.۱۶۲	۰.۸۷۴	۳۴۲-	۰.۶۲۵
تخلخل	۰.۱۳۴	۰.۴۸۷	۱	۰.۵۶۱	۰.۴۷۶	۰.۱۴۴	۰.۳۷۸	۰.۵۷۷	۰.۶۵۵	۰.۶۲۹	۰.۸۰۲	۰.۷۲۴	۰.۳۴۶	۰.۲۳۵
ماسیدگی	۰.۶۷۸	۰.۱۰۲	۰.۵۶۱	۱	۰.۸۱۴	۰.۳۵۸	۰.۸۳۰	۰.۸۲۳	۰.۸۳۲	۰.۳۳۳	۰.۲۲۷	۰.۸۴۶	۰.۳۰۰-	۰.۶۲۴-
حالت ژلی	۰.۴۸۵	۰.۱۰۰-	۰.۴۷۶	۰.۸۱۴	۱	۰.۱۷۸-	۰.۸۲۸	۰.۷۲۷	۰.۸۱۳	۰.۰۷۹	۰.۰۲۶	۰.۶۳۹	۰.۱۷۰-	۰.۵۲۱-
پودری	۰.۴۵۱	۰.۱۲۷	۰.۱۴۴	۰.۳۵۸	۰.۱۷۸-	۱	۰.۱۳۵	۰.۱۲۸	۰.۱۲۸	۰.۱۶۲	۰.۳۳۵	۰.۳۳۵	۰.۳۷۰-	۰
سرعت ذوب	۰.۷۴۲	۰.۳۸۳	۰.۹۲۲	۰.۸۳۰	۰.۱۳۵	۱	۰.۱۳۵	۱	۰.۸۸۷	۰.۱۶۸	۰.۰۵۴-	۰.۱۶۸-	۰.۲۸۷-	۰.۶۵۵-
روغنی بودن	۰.۵۵۰	۰.۲۷۷	۰.۵۹۴	۰.۸۲۳	۰.۷۲۷	۰.۱۲۸	۰.۶۲۷	۱	۰.۷۴۸	۰.۳۲۲	۰.۱۹۲	۰.۶۴۲	۰.۰۲۹	۰.۴۶۵-
پوشش دهانی	۰.۵۳۷	۰.۱۶۸	۰.۶۵۵	۰.۸۳۲	۰.۸۱۳	۰.۱۶۲	۰.۸۸۷	۰.۷۴۸	۱	۰.۱۵۵	۰.۳۲۶	۰.۸۷۵	۰.۰۴۰-	۰.۳۱۶
ظاهر	۰.۱۵۳	۰.۷۲۶	۰.۶۲۹	۰.۸۰۲	۰.۸۱۳	۰.۳۳۳	۰.۸۳۲	۰.۸۱۳	۰.۸۳۲	۱	۰.۸۳۷	۰.۳۹۶	۰.۲۵۲	۰.۱۸۳
رنگ	۰.۱۸۲	۰.۴۹۷	۰.۸۰۲	۰.۲۲۷	۰.۰۲۶	۰.۳۳۵	۰.۰۵۴-	۰.۱۹۲	۰.۳۲۶	۰.۱۶۲	۱	۰.۵۱۳	۰.۳۹۴	۰.۲۴۱
پذیرش کلی	۰.۶۶۰	۰.۱۲۵-	۱	۰.۸۸۸	۰.۸۱۴	۰.۳۵۸	۰.۸۳۰	۰.۸۲۳	۰.۸۳۲	۰.۳۳۳	۰.۲۲۷	۰.۸۴۶	۰.۳۰۰-	۰.۳۶۰
ویسکوزیته	۰.۷۴۱.	۰.۶۶۰	۰.۱۳۴	۰.۶۷۸	۰.۴۸۵	۰.۴۵۱	۰.۷۴۲	۰.۵۵۰	۰.۵۳۷	۰.۱۵۳	۰.۱۸۲	۰.۶۶۰	۰.۳۶۰	۰.۳۱۶
دانسیته	۰.۵۶۴	۰.۰۲۷	۰.۶۲۵	۰.۲۳۵	۰.۵۲۱-	۰	۰.۶۵۵-	۰.۴۶۵-	۰.۴۱۳-	۰.۱۸۳	۰.۳۴۱	۰.۳۶۰-	۰.۳۱۶	۱

شدت رنگ، طعم، سختی و لاستیکی بودن یافت نمونه‌ها بود.

در شکل ۲ انتخاب مولفه‌های اصلی بر اساس مقدار ویژه نشان داده شده است. شیب خط در سه مولفه اول نسبت به سایر مولفه‌ها بیشتر است و در واقع یکی دیگر از تعیین مولفه‌های اصلی در روش PCA توجه به شیب خط نمودار مذکور است (رضایی، ۱۳۸۹). همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده، سه جزء اول (با دارا بودن بیشترین مقادیر ویژه) ۸۱/۷۳۲ درصد از کل واریانس داده‌ها را می‌سازند.

داده‌های جدول ۶ وزن نسبی هر متغیر را در سه جزء اصلی ۱، ۲ و ۳ بعد از چرخش (عملیاتی برای تشخیص بهتر تفاوت‌ها) نشان می‌دهد. با استفاده از این ضرایب امتیاز اجزای اصلی در ارزیابی حسی نمونه‌های مورد آزمون تخمین زده شد. هرچه میزان قدر مطلق این ضرایب بیشتر باشد، خصوصیات اندازه‌گیری شده اهمیت بیشتری در ساختن جزء اصلی مورد نظر داشته است (یگانه زاد، ۱۳۹۱). بنابراین نرمی، حالت ژلی، سرعت ذوب، پوشش دهانی و ویسکوزیته مهمترین اجزای موثر در عامل اول، شیرینی، تخلخل و ظاهر مهمترین اجزا در عامل دوم و پودری مهم ترین جزء در عامل سوم می‌باشد. یگانه‌زاد (۱۳۹۱) از تجزیه به مولفه‌های اصلی برای آنالیز پارامترهای حسی-توصیفی و یافتن عوامل اصلی و بررسی رابطه بین عوامل اصلی و پذیرش کلی در شکلات شیری استفاده کرد. و Kilcas و Clegg (۲۰۰۲) با استفاده از تجزیه به مولفه‌های اصلی روابط بین پارامترهای حسی و فیزیکی را در موس شکلات بررسی کردند.

Haedelt و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که شکلات‌های تولید شده به وسیله آرگون و نیتروژن دارای ویژگی‌هایی از قبیل سخت‌تر بودن، تخلخل کمتر، آهسته‌تر آب شدن در دهان و میزان بالاتر عطر و طعم بودند. این محصولات نسبت به شکلات تولید شده با دی‌اکسید کربن و نیتروز اکسید حالت خامه‌ای و شدت عطر و طعم کاکائویی بیشتری داشتند.

PCA ابعاد ماتریس را با حداقل تغییرات کم می‌کند (*et al.*, Lachnit 2003). ابعاد (ترکیبات اصلی) فضای بدست آمده با توجه به شاخص‌هایی که بیشترین ارتباط را با هر ابعاد برای هر ارزیاب دارد تفسیر می‌شود. در جدول ۵ ضریب همبستگی پارامترهای حسی نشان داده شده است که این ضریب هر چه به ۱ نزدیکتر باشد، نشان‌دهنده رابطه نزدیکتر دو پارامتر می‌باشد. بیشترین میزان همبستگی پذیرش کلی با پوشش دهانی بود که ضریب همبستگی ۰/۸۷۵ داشت. نرمی با ضریب ۰/۸۷۴ و ماسیدگی نیز با ضریب ۰/۸۴۶ رابطه نزدیکی با پذیرش کلی داشت. Zander و Probola (۲۰۰۷) از روش تجزیه به مولفه‌های اصلی برای ارتباط ویژگی‌های بافتی دو نوع گوشت استفاده کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که این تکنیک می‌تواند کاربرد صنعتی داشته باشد. خلیلیان و همکاران (۱۳۹۰) بمنظور بررسی ویژگی‌های حسی و روابط پنهان بین آنها در پوره طالبی از روش تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) استفاده کردند. نتایج نشان داد که از میان ۱۶ صفت حسی تعریف شده برای ارزیابی حسی ژل مک طالبی، مهم‌ترین و مؤثرترین آن‌ها بر پذیرش کلی نمونه‌های پاستیل طالبی،

نتیجه‌گیری

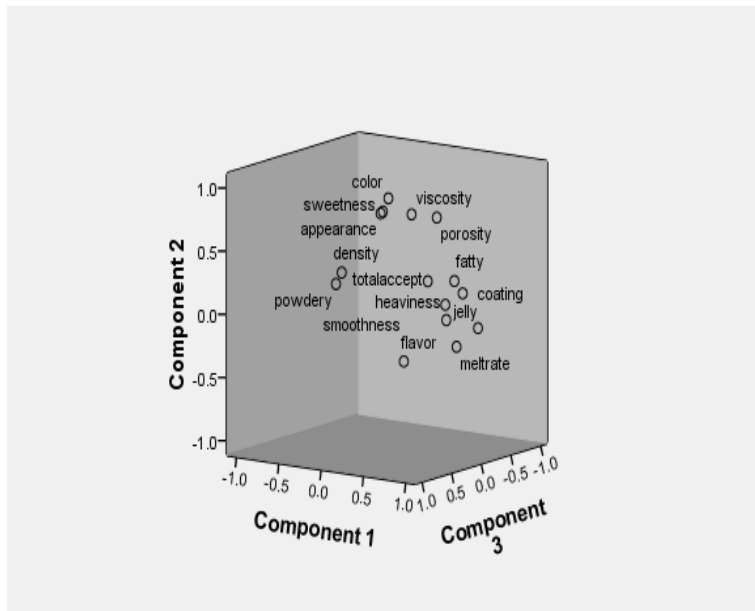
با توجه به بازار پسندی مناسب محصولات کم‌کالری، تولید محصولات بر پایه سیستم کف می‌تواند باعث سودآوری فراوان شود. در این پژوهش بمنظور رسیدن به محصولی با ساختار مناسب از مقادیر مختلف ژلاتین و سدیم کازئینات جهت تولید موس شکلات استفاده شد. مدل پاورلا به دلیل مقادیر مناسب R^2 و RMSE بعنوان بهترین مدل انتخاب شد. نتایج نشان داد با افزایش مقدار ژلاتین و پروتئین، ویسکوزیته محصول افزایش یافت. همچنین نمونه‌های موس شکلاتی حاوی ۲ گرم ژلاتین بیشترین پذیرش کلی را داشتند. پروتئین‌ها نیز به دلیل قابلیت کف‌زایی باعث کاهش دانسیته شد، ولی ژلاتین به دلیل افزایش ویسکوزیته موجب افزایش دانسیته شد.

از بین تیمارهای مختلف مشخص شد که ژلاتین تاثیر بیشتری بر تمامی ویژگی‌های موس داشت؛ بطوری که با تغییر مقدار ژلاتین ساختار موس تغییرات زیادی می‌یافت. با استفاده از روش PCA ارتباط بین ویژگی‌های حسی مشخص گردید و نتایج نشان داد که بیشترین میزان همبستگی پذیرش کلی با نرمی، ماسیدگی و پوشش دهانی بود. پس ویژگی‌های بافتی بیشترین تاثیر را بر ارزیابان حسی داشت. نتایج این پژوهش نشان داد که می‌توان پروتئین سدیم کازئینات را بعنوان جایگزین مناسب سفیده تخم مرغ در فرمولاسیون موس شکلات استفاده نمود.

جدول ۶- ضرایب اولین دو مولفه اصلی بعد از چرخش

	۱	۲	۳
عطرو طعم کاکائو	-۰/۶۱۳	-۰/۲۷۴	-۰/۵۹
شیرینی	-۰/۱۵۷	۰/۷۱۸	-۰/۱۱۷
نرمی	۰/۹۱۷	۰/۰۴۴	۰/۳۰۹
تخلخل	۰/۵۶	۰/۷۶۹	-۰/۰۴
ماسیدگی	-۰/۸۸۶	۰/۱۵۸	۰/۲۸۱
حالت ژلی	۰/۹۵	-۰/۰۸۷	-۰/۱۷۹
پودری	-۰/۰۲۵	۰/۳۲۴	۰/۸۹۶
سرعت ذوب	۰/۹۴۷	-۰/۱۸۳	-۰/۱۸
روغنی بودن	-۰/۷۵۵	۰/۲۸۴	-۰/۰۵۸
پوشش دهانی	-۰/۹۳۱	-۰/۲۲	-۰/۰۵۱
ظاهر	-۰/۰۵۱	۰/۷۹۱	۰/۱۴۳
رنگ	-۰/۱۰۸	-۰/۹	۰/۱۳۲
پذیرش کلی	۰/۷۹۸	-۰/۳۶	۰/۴۵۲
ویسکوزیته	-۰/۱۹۹	-۰/۶۲۲	-۰/۶۹۹
دانسیته	-۰/۶۰۱	۰/۲۰۸	-۰/۰۹۴

میزان نزدیکی پارامترهای مختلف و اثر آن‌ها بر یکدیگر در شکل ۳ نشان داده شده است. مختصات محصولات در PCA نشان‌دهنده میزان ارتباط پارامترها می‌باشد. بعنوان مثال حالت ژلی، پوشش دهانی و سرعت ذوب در دهان در مکان‌هایی نزدیک بهم واقع شده‌اند که بیانگر ارتباط این پارامترهاست.



شکل ۳- سهم ویژگی‌های حسی اندازه‌گیری شده در مولفه‌های اصلی اول و دوم

- Abascal, D.M., and JesUs G.F, 2009, Surface tension and foam stability of commercial calcium and sodium caseinates, *Food Hydrocolloids*, 23, 1848–1852.
- Abu-Jdayil, B., and Mohameed, H, 2002, Experimental and modelling studies of the flow properties of concentrated yogurt as affected by the storage time, *Journal of Food Engineering*, 52, 359–365.
- BahramParvar, M., Razavi, S.M., and Khodaparast, M.H, 2010, Rheological characterization and sensory evaluation of a typical soft ice cream made with selected food hydrocolloids, *Food Science Technology Int*, 79-88.
- Davis, J.P., and Foegeding, E.A, 2007, Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins, *Colloids and SurfacesB: Biointerfaces*, 54, 200–210.
- Emadzadeh, B, 2011, Formulation of low-calorie pistachio butter and evaluation of the rheological, sensory and chemical characteristics: A surface response methodology. PhD thesis. Ferdowsi university of Mashhad.
- Emadzadeh, B., Razavi, S.M.A., and Hashemi, M, 2011, Viscous flow behavior of low calorie pistachio butter: A response surface methodology, *International journal of nuts and related sciences*, 2, 37-47.
- Haedelt, J., Beckett, S.T., and Niranjana, K, 2007, Bubble-included chocolate: relating structure with sensory response, *Journal of Food Science*, Vol. 72, Nr. 3.
- Indrawati, L., Wang, Z., Narsimhan, G., and Gonzalez, J, 2008, Effect of processing parameters on foam formation using a continuous system with a mechanical whipper, *Journal of Food Engineering*, 88, 65–74.
- Kilcast, D., and Clegg, S, 2002, Sensory perception of creaminess and its relationship with food structure, *Food Quality and Preference*, 13, 609–623.
- Khalilian, S., F. Shahidi, M. Elahi, M. Mohebbi Formulation of new products, fruit puree cantaloupe (Mac gel) by RSM and PCA methods. *Quarterly Journal of food processing and preservation*. 2(1):41-54
- Lachnit, M., Busch-Stockfisch, M., Kunert, J., & Krahl, J, 2003, Suitability of free choice profiling for assessment of orange-based carbonated soft drinks, *Food Quality and Preference*, 14, 257–263.
- Mohammadi moghaddam, T., Razavi seyed, M.A., Malekzadegan, F., Shaker ardekani, A, 2009, Chemical composition and rheological characterization of pistachio green hulls marmalade, *Journal of Texture Studies*, 40, 390–405.
- Morr, J., Kinsella, E., and Charles, V, 2012, Milk proteins: Physicochemical and functional properties, *Food science and nutrition*, Volume 21, Issue 3.
- Nicorescu, I., Vial, C., Talansier, E., Lechevalier, V., Loisel, C., Della Valle, D., Riaublanc, A., Djelveh, G., Legrand, J, 2011, Comparative effect of thermal treatment on the physicochemical properties of whey and egg white protein foams, *Food hydrocolloids*, 25, 797-808.
- Pernell, C.W., Foegeding, E.A., Luck, P.J., and Davis, J.P, 2002, Properties of whey and egg white protein foams. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204, 9–21.
- Probola, G., and Zander, L, 2007, Application of PCA method for characterisation of textural properties of selected ready-to-eat meat products, *Journal of Food Engineering* 83, 93–98.
- Rezai, R., 2010, Optimization of plum Pastille Formulation. M.Sc thesis. Ferdowsi university of Mashhad.
- Sakiyan, O., Sumnu, G., Sahin, S., and Bayram, G, 2004, Influence of fat content and emulsifier type on the rheological properties of cake batter, *European Food Research and Technology*, 635-638.
- Schrieber, R. 1976. Edible Gelatin: Types, Properties, Use and Applications in the Food Industry. Gordian. pp.356-364.
- Yeganezad, S., 2013, Optimization probiotic milk chocolate containing soy protein. PhD thesis. Ferdowsi university of Mashhad.

Study of organoleptic and rheological properties of chocolate mousse incorporating sodium caseinate and gelatin

S. Mirarab Razi¹, M. Mohebbi^{2*}, M. H. Haddad Khodaparast³, A. Koocheki⁴

Received: 2014.01.12

Accepted: 2014.08.19

Introduction: Proteins are widely used in food industry because it has functional properties such as formation and stabilization of foam systems. These molecules had surface-active properties. They rapidly adsorb at interface during the foaming processes and form a film around gas bubbles. The bulk properties has important role in the stabilization foam system. It has been shown that protein adsorption is influenced by molecular properties, such as size, shape, surface hydrophobicity, conformation, and charge and conditions in the bulk solution, such as bulk concentration, pH and ionic strength. The foaming properties depend on many intrinsic factors (size, structure of protein, hydrophobicity, surface potential, charge, etc.); and environmental and processing factors (protein concentration, pH, temperature, addition of other ingredients, etc.) Foams are colloidal systems in which gas phase dispersed in an aqueous continuous phase. Foaming operation is usually devoted to produce lighter products, modify the appearance and the texture of food products, therefore, it be used to production new products adapted to consumer choice and needs, using air as a zero-cost component. Microstructure has fundamental role in foam properties. At foam based products, bubble size is of most importance at the foam properties, because it influences on texture, the mouth-feel and the stability of the aerated product. Many food products have aerated structure. In these foods, the gas phases, forms small bubbles that modify microstructure and mouth feel properties of product. Aerated desserts have shown a great market potential, which is dependent on consumer behavior, interested in lighter and healthier products. Food products based on foam structure such as chocolate mousse have good marketing; therefore deep knowledge about their properties is important. Mousse is an aerated dessert with stabilized foamy structure which little attention has been paid to industrial production. Although, the most popular mousse flavor is chocolate, orange, lemon and strawberry have good marketability.

Materials and method: This study follows two important objectives; first, the effect of different amount of gelatin concentration and sodium caseinate on rheological, physical and sensory properties of chocolate mousse is investigated. Then, the relationship this parameters was discussed on the basis of laboratory results using PCA method. Chocolate mousse was include of, Gelatin(Bangladesh, type B, bloom 160-180), Cacao powder(Cargill Co., Netherlands), Whipped cream(Mahrang sahar shargh CO., Iran 27% fat), Sugar(Fariman, Iran) and Sodium caseinate (Milad, Iran). Chocolate mousse samples were prepared with different amount of gelatin (1, 2 and 3 gr) and sodium caseinate (1, 2 and 3 gr) concentrations. Gelatin was first dissolved in hot water. Next, cacao powder and sugar were stirred in hot water and added to whipped cream agitated by Gosonic home mixer with speed 5400 RPM for 3 minutes. Then, Sodium caseinate was mixed in distilled water for 2 minutes and added to mixture prepared. Finally, mousse was placed in refrigerator after stirring with gelatin solution. The samples were stored in a refrigerator for 24 hours.

Results and Discussion: In this work, physical, sensorial and rheological properties of chocolate mousse were investigated. Rheological measurements were carried out using a rotational viscometer (Bohlin Model Visco 88, Bohlin Instruments, UK) equipped with a heating circulator (Julabo, Model F12-MCand, Julabo Labortechnik, Germany) and C30 spindle. All the experiments were performed at 25°C±0.2. A pre shearing of 10-15 s at 14.1 s was applied to all samples. Sample flow was measured by registering the shear stress/ shear rate data at an increasing trend from 14.1 to 300 s. To describe the time independent flow behavior, the experimental

1- MSc student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2 and 3- Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

4- Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(*Corresponding author: mohebbatm@gmail.com)

data (shear stress-shear rate) were fitted by Herschel- Bulkley, Bingham, power law, and Casson models. Sensorial properties were tested at the same optical condition and environmental temperature. Chocolate mousses were evaluated using hedonic analysis procedures by a sensory panel of ten assessors, who had been selected and trained. Sensorial properties were evaluated based on 1 to 9 scores. The gas hold-up was calculated by comparing the density of the aerated chocolate with the gas-free density of solid chocolate. PCA method was used for determination of the relation of sensory attributes and main component.

Conclusion: Results showed that chocolate mousse incorporating 2 gr gelatin and 3 gr sodium caseinate had the best sensory properties. According to the R^2 ($R^2 > 0.99$) and RMSE values, it is obvious that the Power-law models can properly describe non-newtonian flow behavior of samples. Behavior index (n) and consistency coefficient (k) were obtained from fitting power-law model. Consistency coefficient was high in the sample containing 3 gr gelatin and 3 gr sodium caseinate. Density values decreased with increase in protein content and decrease in gelatin content. Based on PCA results, total acceptance of samples was severely related to the smoothness, jelly and melting rate attributes.

Keywords: Rheology, Gelatin, Sodium Caseinate, Chocolate Mousse

Contents

Optimization of mangrove leaf extraction by mixture design and investigation of its antimicrobial effect on <i>Listeria innocua</i>, <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Escherichia coli</i>	212
B. Alizadeh Behbahani, A. Alghooneh, F. Tabatabaei Yazdi, F. Shahidi, M. Mohebbi	
Study on Textural Properties of Pear Fruit during Drying in a Cabinet Dryer	215
M. M. Heydari Foroushani, S. M. Nasiri	
Investigation the effect of cabinet drying conditions and different pretreatments on drying rate of grape and quality of raisin	237
A. Ayoubi, N. Sedaghat, M. Kashaninejad, M. Mohebbi, M. Nassiri Mahalati	
Oxidative stability of Purified Common Kilka (<i>Clupeonella cultiventris caspia</i>) triacylglycerols as affected by the Bene kernel and hull oils and their Unsaponifiable matters	248
S. Pazhouhanmehr, R. Farhoosh, R. Esmailzadeh Kenari, A. Sharif	
Comparative Study on Some Physical and Chemical Properties of Three Native Seed <i>Berberis</i> Genotypes from Semnan Province	259
M. Farhadi Chitgar, M. Varidi, M. J. Varidi, A. Balandari	
Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation	274
B. Ghanbarzadeh, A. Pezeshky, H. Hamishehkar, M. Moghadam	
Performance of antimicrobial bio active zein film against <i>Escherichia coli</i> and <i>Listeria innocua</i> during storage of Olivier salad	284
M. Kashiri	
Effects of <i>Ocimum basilicum</i> and <i>Salvia sclarea</i> essential oils on <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Aspergillus flavus</i> in Iranian white cheese	294
M. Azizkhani, F. Tooryan, M. Boreiri	
Comparison of anti-oxidative properties of fresh <i>Berberis (integerrima × Vulgaris)</i> in Aqueous and alcoholic solvents	306
F. Sharifi, L. Pourakbar	
Release modeling of Nano-encapsulated bioactive compounds of saffron from inner phase of W/O/W double emulsions	316
A. AridiEsfanjani, S. M. Jafari, E. Assadpoor, H. Mirzaei	
A molecular method for identification of aflatoxigenic fungi in pistachio of Khorasan region (Gonabad and Feyzabad)	328
N. Pourebrahim, M. Yavarmanesh	
Study of organoleptic and rheological properties of chocolate mousse incorporating sodium caseinate and gelatin	339
S. Mirarab Razi, M. Mohebbi, M. H. Haddad Khodaparast, A. Koocheki	

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 12

No. 2

2016

Published by: Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Executive Manager: Poorazarang, H.

Editor-in-Chief: Razavi, Seyed M. A.

Executive Director: Taghizadeh, M.

Editorial Board:

Ehsani, M.R.	Prof. in Dairy Technology
Farahnaki, A.	Assoc. Prof. in Food Engineering
Farhoosh, R.	Prof. in Food Chemistry
Fazli Bazzaz, S.	Prof. in Microbiology
Habibi najafi, M.	Prof. in Microbiology
Kadivar, M.	Assoc. Prof. in Food Chemistry
Kashaninejad, M.	Assoc. Prof. in Food Engineering
Khomeiri, M.	Assoc. Prof. in Microbiology
Khosroshahi, A.	Prof. in Dairy Technology
Mortazavi, Seyed A.	Prof. in Microbiology and Biotechnology
Pourazerang, H.	Prof. in Food Chemistry
Razavi, Seyed M. A.	Prof. in Food Engineering
Sahari, M. A.	Prof. in Food Chemistry
Sedaghat, N.	Assoc. Prof. in Food Packaging
Shahidi, F.	Prof. in Microbiology
Varidi, M.J.	Assoc. Prof. in Food technology

Printed by: Ferdowsi University of Mashhad Press, Iran.

Address: The Iranian Food Science & Technology Research Journal, Scientific Publication Office, Food Science and Technology Department, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

P.O.BOX: 91775- 1163

Phone: (98)511-8795618-20(321)

Fax: (98)511-8787430

E-Mail: ifstrj@um.ac.ir

Web Site: http://jm.um.ac.ir/index.php/food_tech/index

This journal is indexed in ISC, SID, and MAGIRAN.



Ferdowsi University
of Mashhad

Vol.12

No2

2016

Iranian Food Science and Technology Research Journal



ISSN:1735-4161

Contents

Optimization of mangrove leaf extraction by mixture design and investigation of its antimicrobial effect on <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Escherichia coli</i> B. Alizadeh Behbahani, A. Alghooneh, F. Tabatabaei Yazdi, F. Shahidi, M. Mohebbi	212
Study on Textural Properties of Pear Fruit during Drying in a Cabinet Dryer M. M. Heydari Foroushani, S. M. Nasiri	215
Investigation the effect of cabinet drying conditions and different pretreatments on drying rate of grape and quality of raisin A. Ayoubi, N. Sedaghat, M. Kashaninejad, M. Mohebbi, M. Nassiri Mahalati	237
Oxidative stability of Purified Common Kilka (<i>Clupeonella cultiventris caspia</i>) triacylglycerols as affected by the Bene kernel and hull oils and their Unsaponifiable matters S. Pazhouhanmehr, R. Farhoosh, R. Esmaeilzadeh Kenari, A. Sharif	248
Comparative Study on Some Physical and Chemical Properties of Three Native Seed <i>Berberis</i> Genotypes from Semnan Province M. Farhadi Chitgar, M. Varidi, M. J. Varidi, A. Balandari	259
Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation B. Ghanbarzadeh, A. Pezeshky, H. Hamishehkar, M. Moghadam	274
Performance of antimicrobial bio active zein film against <i>Escherichia coli</i> and <i>Listeria innocua</i> during storage of Olivier salad M. Kashiri	284
Effects of <i>Ocimum basilicum</i> and <i>Salvia sclarea</i> essential oils on <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Aspergillus flavus</i> in Iranian white cheese M. Azizkhani, F. Tooryan, M. Boreiri	294
Comparison of anti-oxidative properties of fresh <i>Berberis (integerrima × Vulgaris)</i> in Aqueous and alcoholic solvents F. Sharifi, L. Pourakbar	306
Release modeling of Nano-encapsulated bioactive compounds of saffron from inner phase of W/W double emulsions A. aridiEsfanjani, S. M. Jafari, E. Assadpoor, H. Mirzaei	316
A molecular method for identification of aflatoxigenic fungi in pistachio of Khorasan region (Gonabad and Feyzabad) N. Pourebrahim, M. Yavarmanesh	328
Study of organoleptic and rheological properties of chocolate mousse incorporating sodium caseinate and gelatin S. Mirarab Razi, M. Mohebbi, M. H. Haddad Khodaparast, A. Koocheki	339