نشریه علمی - پژوهشی

پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران

جلد۱۲ شماره ۴

سال ۱۳۹۵

شاپا: ۱۷۳۵-۴۱۶۱

عنوان مقالات

بررسی تاثیر تلقیح کپک *Aspergillus flavus* بر تغییرات میزان اسیدهای چرب، اندیس پراکسید و تولید آفلاتوکسین در چهار واریته رایج بادام زمینی برداشت شده از سطح مزارع استان گلستان ۳۹٤

مریم ابراهیمی، مرتضی خمیری، یحیی مقصودلو

بررسی تأثیر رقم، اسمز، بسته‌بندی و دمای نگهداری بر ویژگی‌های کمی و کیفی برگه‌ی خربزه ٤۰۳

شهره نیکخواه- ناصر صداقت

بررسی اثر پوشش خوراکی ژلاتین-کربوکسی متیل سلولز بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی پسته برشته شده طی زمان ماندگاری ٤۱۵

ناصر صداقت، سارا خشنودی‌نیا

مطالعه تأثیر صمغ عربی، پروتئین‌های تغلیظ شده شیر و آب پنیر بر خصوصیات کیفی ماست سین‌بیوتیک حاوی ترانس گلوتامیناز میکروبی ٤۲۸

آیدا صالح، محمود رضازاد باری، محمد علی زاده، نجمه صباحی

بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی فلور لاکتیکی جدا شده از مراحل تولید کره مسکه علیه باکتری‌های شاخص مواد غذایی ... ٤۳۸

محمد رضا عدالتیان دوم، مسعود یاورمنش ، فریبا قیامتی یزدی، مرتضی خمیری، ندا نیری

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی کانژوگه‌های پروتئین‌های سویای رسوب‌یافته با اسید و مالتودکسترین ٤۵۳

ساره بوستانی، محمود امینلاری، مرضیه موسوی نسب، مهرداد نیاکوثری، غلامرضا مصباحی

مقایسه‌ی ویژگی‌های کاربردی پروتئین‌های جدا شده از عضله‌ی تیره‌ی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با استفاده از فرآیندهای تغییر pH اسیدی و قلیایی ٤٦۳

نرجس دماوندی کمالی، امیررضا شویکلو، علی معتمدزادگان

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اولئوگم رزین کندر (*Boswellia serrata*) در روغن سویا ٤۷۷

عادله محمدی ، سعیده عربشاهی دلویی

تعیین خاصیت ضداکسیدانی، محتوای پلی‌فنل کل و شمارش کلی بار میکروبی شیر طعم‌دارحاوی عصاره پوست انار و شهد خرما طی نگهداری در سرما ٤۸۹

رؤیا کاظمی زاده، وجیهه فدائی نوغانی

ریزپوشانی روغن نعناع (*Menthaspicata*) به روش خشک کردن پاششی ٤۹۹

ستاره حسین زاده، محمدحسین حداد خداپرست، آرام بستان، محبت محبی

ادامه فهرست داخل جلد

نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران

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

جلد ۱۲ شماره ۴ آبان- آذر ۱۳۹۵

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

صاحب امتیاز: گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: دکتر هاشم پورآذرنگ — استاد، شیمی مواد غذایی (دانشگاه فردوسی مشهد)

سردبیر: دکتر سید محمد علی رضوی — استاد، مهندسی وخواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

کارشناس امور اجرایی: دکتر مسعود تقی زاده — استادیار، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

اعضای هیات تحریریه:

دکتر محمدرضا احسانی	استاد، تکنولوژی لبنیات، دانشگاه تهران
دکتر هاشم پورآذرنگ	استاد، شیمی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر محمدباقر حبیبی نجفی	استاد، میکروبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر اصغر خسروشاهی	استاد، تکنولوژی لبنیات، دانشگاه ارومیه
دکتر مرتضی خمیری	دانشیار، میکروبیولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دکتر سید محمد علی رضوی	استاد، مهندسی و خواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر محمد علی سحری	استاد، شیمی مواد غذایی، دانشگاه تربیت مدرس
دکتر فخری شهیدی	استاد، میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر ناصر صداقت	دانشیار، بسته بندی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر عسگر فرحناکی	دانشیار، مهندسی و خواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه شیراز
دکتر رضا فرهوش	استاد، شیمی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز	استاد، میکروبیولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
دکتر مهدی کاشانی نژاد	دانشیار، مهندسی و خواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دکتر مهدی کدیور	دانشیار، شیمی مواد غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان
دکتر سید علی مرتضوی	استاد، میکروبیولوژی وبیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر محمدجواد وریدی	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 وصنایع غذایی- دفتر نشریه پژوهش های علوم وصنایع غذایی ایران.

تلفن: ۲۰-۸۷۹۵۶۱۸ داخلی ۳۲۱ نمابر: ۸۷۸۷۴۳۰

این نشریه درپایگاههای 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.

بسم الله الرحمن الرحیم

مندرجات

بررسی تاثیر تلقیح کپک *Aspergillus flavus* بر تغییرات میزان اسیدهای چرب، اندیس پراکسید و تولید آفلاتوکسین در چهار واریته رایج بادام زمینی برداشت شده از سطح مزارع استان گلستان ۳۹۴

مریم ابراهیمی، مرتضی خمیری، یحیی مقصودلو

بررسی تأثیر رقم، اسمز، بسته‌بندی و دمای نگهداری بر ویژگی‌های کمی و کیفی برگه‌ی خربزه ۴۰۳

شهره نیکخواه- ناصر صداقت

بررسی اثر پوشش خوراکی ژلاتین-کربوکسی متیل سلولز بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی پسته برشته شده طی زمان ماندگاری ۴۱۵

ناصر صداقت، سارا خشنودی‌نیا

مطالعه تأثیر صمغ عربی، پروتئین‌های تغلیظ شده شیر و آب پنیر بر خصوصیات کیفی ماست سین‌بیوتیک حاوی ترانس گلوتامیناز میکروبی ۴۲۸

آیدا صالح، محمود رضازاد باری، محمد علی زاده، نجمه صباحی

بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی فلور لاکتیکی جدا شده از مراحل تولید کره مسکه علیه باکتری‌های شاخص مواد غذایی ۴۳۸

محمد رضا عدالتیان دوم، مسعود یاورمنش ، فریبا قیامتی یزدی، مرتضی خمیری، ندا نیری

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی کانژوگه‌های پروتئین‌های سویای رسوب‌یافته با اسید و مالتودکسترین ۴۵۳

ساره بوستانی، محمود امینلاری، مرضیه موسوی نسب، مهرداد نیاکوثری، غلامرضا مصباحی

مقایسه‌ی ویژگی‌های کاربردی پروتئین‌های جدا شده از عضله‌ی تیره‌ی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با استفاده از فرآیندهای تغییر pH اسیدی و قلیایی ۴۶۳

نرجس دماوندی کمالی، امیررضا شویکلو، علی معتمدزادگان

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اولئوگم رزین کندر (*Boswellia serrata*) در روغن سویا ۴۷۷

عادله محمدی ، سعیده عربشاهی دلویی

تعیین خاصیت ضداکسیدانی، محتوای پلی‌فنل کل و شمارش کلی بار میکروبی شیر طعم‌دارحاوی عصاره پوست انار و شهد خرما طی نگهداری در سرما ۴۸۹

رؤیا کاظمی زاده، وجیهه فدائی نوغانی

ریزپوشانی روغن نعناع (*Menthaspicata*) به روش خشک کردن پاششی ۴۹۹

ستاره حسین زاده، محمدحسین حداد خداپرست، آرام بستان، محبت محبی

مدل‌سازی سینتیک انتقال جرم طی فرایند سرخ‌کردن عمیق ناگت مرغ پوشش داده شده با خمیرآبه حاوی صمغ قدومه شهری و ایزوله پروتئین سویا ۵۱۲

حامد مهدویان مهر، آرش کوچکی، محبت محبی

کوتاه پژوهشی

بهینه‌سازی میزان کانژوگه شدن پروتئین‌های ایزوله سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد ۵۲۶

ساره بوستانی، محمود امینلاری، مرضیه موسوی نسب، مهرداد نیاکوثری، غلامرضا مصباحی

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 394-402

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۰۲-۳۹۴

بررسی تاثیر تلقیح کپک *Aspergillus flavus* بر تغییرات میزان اسیدهای چرب، اندیس پراکسید و تولید آفلاتوکسین در چهار واریته رایج بادام زمینی برداشت شده از سطح مزارع استان گلستان

مریم ابراهیمی[۱]، مرتضی خمیری[۲*]، یحیی مقصودلو[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۱۲

چکیده

بادام‌زمینی یکی از حساس‌ترین محصولات کشاورزی در برابر هجوم *A. flavus* و متعاقبا آلودگی به آفلاتوکسین محسوب می‌شود. در این پژوهش پس از جداسازی و تائید شناسایی *A. flavus* از نمونه‌های بادام‌زمینی آلوده شده به این کپک، مقادیر مشخصی از آن به چهار واریته بادام‌زمینی رایج استان گلستان به نام‌های گلی، محلی، چینی و هندی که در شرایط مناسب خشک و پوست‌گیری شدند تلقیح گردید. سپس تاثیر تلقیح کپک مذکور (پس از یک هفته رشد در دمای ۲۶ °C) بر روی تغییرات اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک، اندیس پراکسید و تولید آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت. بمنظور ارزیابی تغییرات اسیدهای چرب از کروماتوگرافی گازی و جهت بررسی میزان آفلاتوکسین B_1 از الایزای رقابتی مستقیم استفاده شد. جهت ارزیابی میزان حساسیت ارقام بادام‌زمینی به رشد *A. flavus* آفلاتوکسین‌زا نیز میزان تشکیل پرگنه کپک بر روی مغز بادام‌زمینی و میزان اسپور تولیدی محاسبه گردید. نتایج حاصل، نشان داد که در بین واریته‌های مختلف، واریته گلی و واریته هندی به ترتیب کمترین و بیشترین حساسیت را به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین B_1 دارا بودند. همچنین با رشد *A. flavus* بر روی مغز بادام‌زمینی، بطور معنی‌داری (α = ٪۵) میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک، کاهش و اندیس پراکسید افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: بادام‌زمینی، *Aspergillus flavus*، الایزای رقابتی مستقیم، کروماتوگرافی گازی، آفلاتوکسین B_1

مقدمه

بادام‌زمینی با نام علمی *آراچیس هیپوجیا*[۴] یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در سراسر جهان به شمار می‌آید. منشأ این گیاه، آمریکای جنوبی است و در مناطقی که میانگین بارندگی ۱۲۰۰- ۵۰۰ میلی‌متر و متوسط دمای روزانه بالاتر از ۲۰°C دارند، کشت می‌شود (Brown, 2012؛ Danehowe,2012). حدود ۵۸٪ از سطح زیر کشت و ۶۷٪ از کل تولید جهانی بادام‌زمینی مربوط به آسیا است (ICRISAT, 2004). طبق آخرین آمار وزارت جهاد کشاورزی (اداره کل آمار و اطلاع‌رسانی)، سطح زیر کشت بادام‌زمینی در ایران معادل ۳۱۰۹۰۰ هکتار بوده است (سال زراعی،۱۳۸۶). قارچ‌های توکسین‌زا بصورت گسترده‌ای در محصولات کشاورزی به ویژه در دانه‌های روغنی، غلات و میوه‌های خشک شده رشد می‌کنند (Cunningham و همکاران، ۲۰۰۶). اگرچه واریته‌های مختلفی از کپک‌ها توانایی تولید این سموم را دارند ولی تولید آن‌ها در این محصولات تنها به چند جنس محدود مربوط می‌شود (Cunningham و همکاران، ۲۰۰۶؛ Rai و همکاران، ۲۰۱۲).

از مهم‌ترین توکسین‌های تولید شده در دانه‌های روغنی مخصوصا بادام زمینی می‌توان به آفلاتوکسین B_1 اشاره کرد (Cunningham و همکاران، ۲۰۰۶). آفلاتوکسین توسط گونه‌هایی از *Aspergillus* تولید می‌شود که می‌توانند قبل از برداشت یا در حین نگهداری، دانه-های روغنی را آلوده نمایند.

سازمان بهداشت جهانی[۵] در سال ۱۹۹۳، آفلاتوکسین را جزء ترکیبات سرطان‌زا برای انسان قرار داد (Li و همکاران، ۲۰۰۹). در اکثر نقاط دنیا تحقیقات گسترده‌ای با هدف شناسایی ارقام مقاوم

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
(* - نویسنده مسئول: Email: mkhomeiri@yahoo.com)

4 *Arachis hypogaea*

5 World Health Organization

محصولات مختلف غذایی نسبت به *A. flavus* آفلاتوکسین‌زا صورت گرفته و نتایج موفقیت‌آمیزی از آن‌ها گزارش شده است. در ایران، بیشتر مطالعات بر روی پسته متمرکز شده و در خصوص بادام‌زمینی، تحقیقات چندانی بمنظور شناسایی واریته مقاوم‌تر صورت نگرفته است. با توجه به اینکه ترکیبات تشکیل‌دهنده مغز بادام‌زمینی به خصوص پروتئین، از مهم‌ترین عوامل موثر بر رشد کپک و تولید آفلاتوکسین بشمار می‌آیند و از طرفی تفاوت در ترکیبات شیمیایی ارقام مختلف یک محصول می‌تواند مبنای حساسیت یا مقاومت آن نسبت به رشد کپک و تولید آفلاتوکسین باشد. از این رو این تحقیق با فرض اینکه حساسیت ارقام مختلف بادام‌زمینی نسبت به حضور کپک‌های تولید کننده آفلاتوکسین و مقدار آن متفاوت است و بین تولید آفلاتوکسین و تغییرات اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک ارتباط معنی‌داری وجود دارد، جهت دستیابی به اهداف زیر انجام شده است:

۱) تعیین مقاوم‌ترین واریته رایج بادام زمینی در استان گلستان نسبت به رشد کپک *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین

۲) بررسی ارتباط بین رشد کپک *A. flavus* و آفلاتوکسین تولیدی آن با میانگین درصد ترکیبات بادام‌زمینی

۳)بررسی ارتباط بین رشد کپک *A. flavus* و میزان تولید آفلاتوکسین و تغییرات اسیدهای چرب اولئیک، لینولئیک و عدد پراکسید.

مواد و روش‌ها

انتخاب و جمع‌آوری ارقام مختلف بادام زمینی

در این پژوهش، عملیات برداشت ۴ واریته رایج بادام‌زمینی کشت شده در سطح استان گلستان به نام‌های گلی و محلی (واریته‌های ایرانی)، چینی و هندی (واریته‌های وارداتی) از مزارع شهرستان‌های کلاله و مینودشت در تاریخ ۱۷ مهر ماه توسط کارشناسان اداره جهاد کشاورزی استان گلستان مطابق با استاندارد ملی ایران (شماره ۲۵۸۱) انجام شد و پس از آن، نمونه‌های مذکور در شرایط مطلوب، خشک و تحت خلاء به کمک دستگاه وکیوم، بسته‌بندی و تا زمان انجام آزمایش‌های لازم در یخچال نگهداری شدند(لازم به ذکر است که زمان کشت این محصول از پانزدهم فروردین آغاز و زمان برداشت آن از اوایل مهر ماه تا اواخر آبان ماه ادامه دارد).

جداسازی و تایید شناسایی کپک *A. flavus* و بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین B_1 توسط آن

پس از جداسازی کپک *A. flavus* از نمونه‌های بادام‌زمینی آلوده و رشد و اسپورزایی آن در سطح محیط کشت Agar Malt Extract (مرک، آلمان)، خصوصیات مورفولوژیکی همچون شکل، تعداد ردیف استریگما، کونیدی و سایر خصوصیات کپک مورد بررسی قرار گرفت (Klich و همکاران، ۲۰۰۶). برای بررسی خاصیت آفلاتوکسین‌زایی جدایه کپک و اطمینان از تولید آفلاتوکسین B_1، از محیط کشت مایع Sucrose Low Salts Medium (مرک، آلمان) استفاده شد. در پایان یک هفته از رشد قارچ در این محیط کشت، توده میسیلیومی آن جدا و سپس آفلاتوکسین به روش BF[1] استخراج گردید (Arrus و همکاران، ۲۰۰۵). در نهایت نوع و میزان آفلاتوکسین B_1 توسط کیت الایزای تهیه شده از شرکت روکت اینترنشنال (آلمان) به روش الایزای رقابتی مستقیم (واکنش رقابتی بین آنتی ژن نمونه با آنتی ژن نشان‌دار شده در اتصال به آنتی‌بادی اختصاصی) و دستگاه الایزاریدر S-2000 (آلمان)، مورد بررسی قرار گرفت (Wen sun, 2008؛Leszczynska و همکاران،۲۰۰۱). مواد و وسایل موجود در کیت الایزا شامل پلیت مخصوص ۹۶ خانه‌ای پوشش داده شده با سرم آلبومین گاوی، استاندارد آفلاتوکسین B1، محلول کونژوگه (AFB_1-BSA نشاندار شده با آنزیم پراکسیداز)، آنتی‌سرم آفلاتوکسین، محلول کروموژن p- نیتروفنل فسفات، محلول اسید سولفوریک ۱ نرمال و بافر شستشوی فسفات سالین۰/۱ مولار حاوی ۰/۰۵ ٪ توین ۲۰ بود.

اندازه‌گیری ترکیبات مغز ارقام بادام زمینی

میزان چربی موجود در مغز نمونه‌های بادام‌زمینی قبل از تلقیح با کپک به روش سوکسله (AOAC[2]، ۲۰۰۰)، پروتئین به روش کلدال (AOAC، ۲۰۰۰)، خاکستر به کمک حرارت (AOAC، ۲۰۰۰)، رطوبت به روش حرارت بالا در دستگاه آون (AOAC، ۲۰۰۰)، قند احیاء کننده به روش حجمی لین- آینون (AOAC، ۲۰۰۰)، پراکسید به روش لی (AOAC، ۲۰۰۰) و میزان اسیدهای چرب با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی (Wen Sun، ۲۰۰۸) اندازه گیری شد. دستگاه کروماتوگرافی گازی بکار رفته در این پژوهش، ساخته شرکت واریان[3]، مدل سی- پی ۳۸۰۰[4] (آمریکا) بود. گاز حامل آن، نیتروژن با جریان ۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه، سوخت گاز هیدروژن با جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه و جریان هوا با سرعت ۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه، ستون مویینه با نام دی- بی- واکس[5] با طول ۵۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲ میکرومتر، برنامه دمایی ایزوترمال با دمای ۲۲۰°C در طول آنالیز، آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای[6] با دمای ۲۸۰°C، دمای تزریق نمونه ۲۲۰°C، زمان نگهداری ۳۰ دقیقه

1 Best food method
2 Association of official analytical chemist
3Varian
4 CP-3800
5 DB-WAX
6 Flame ionization detector

و روش آنالیز نرمال کردن پیک کروماتوگرام بود (Zamora و همکاران، ۲۰۰۴).

بررسی تاثیر تلقیح کپک *A. flavus* بر تغییرات میزان اسیدهای چرب، اندیس پراکسید و تولید آفلاتوکسین B_1 و شناسایی رقم مقاوم

بمنظور محاسبه میزان رشد و تشکیل پرگنه قارچ، مقدار ۲۰ گرم مغز بادام‌زمینی از هر واریته با کمک هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی شد و سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون قارچ (با غلظت ۲×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی‌لیتر) به نمونه‌ها تلقیح گردیده و به مدت یک هفته در دمای ۲۶ °C نگهداری شدند (Hoskisson و همکاران، ۲۰۰۰؛ Nagarajan و همکاران، ۱۹۹۲).

هشت روز پس از تلقیح، میانگین درصد رشد قارچ بر اساس پوشش سطح بادام‌زمینی، مقدار اسپور تولیدی با کمک لام هموسایتومتر، آفلاتوکسین B_1 تولید شده با کمک کیت الایزا، تاثیر تشکیل پرگنه قارچ بر روی هیدرولیز اسیدهای چرب و عدد پراکسید (در دو حالت همراه با ریسه‌های کپک و پس از جداسازی ریسه‌های کپک) مورد بررسی قرار گرفت.

برای جداسازی ریسه‌های کپک، ۸ روز بعد از تلقیح، مغزهای بادام زمینی به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر استریل منتقل و بر روی شیکر قرار گرفتند. در صورت باقی‌ماندن مقداری میسیلیوم بر روی مغز، توسط پنس به طور کامل از سطح بادام‌زمینی جدا و سپس مغزهای شسته شده در آون خشک گردیدند تا از تولید بیشترآفلاتوکسین جلوگیری شود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار و در قالب طرح پایه کاملا تصادفی انجام شد. داده‌های به دست آمده نیز توسط نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح α=٪۵ انجام شد (SAS، ۲۰۰۳).

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی ارقام ختلف بادام زمینی قبل از تلقیح با کپک

بر اساس نتایج بدست آمده، واریته‌های هندی و محلی به ترتیب با ۵۱/۲۶ و ۴۴/۷۷ میانگین درصد چربی دارای بیشترین و کمترین میزان چربی و واریته‌های محلی و هندی با ۲۴/۲۸ و ۲۰/۰۲ میانگین درصد به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار پروتئین بودند. همچنین مقادیر قند احیاء کننده ۴/۵۳- ۳/۵۶ میانگین درصد، خاکستر ۲/۴۳-۱/۹۸ میانگین درصد و رطوبت ۳/۳۳ تا ۳/۵۶ میانگین درصد در واریته‌های مختلف، متغیر بودند. واریته‌های محلی و گلی به ترتیب بیشترین و واریته‌های هندی و چینی به ترتیب کمترین میزان اسید اولئیک را دارا بودند. همچنین بین واریته‌های هندی با چینی و گلی با معمولی از نظر میزان اسید چرب لینولئیک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و در مجموع واریته‌های هندی و چینی دارای بیشترین و واریته‌های گلی و معمولی دارای کمترین مقدار اسید لینولئیک بودند. (جدول ۱). این نتایج با نتایج ارائه شده توسط USDA (۲۰۰۲) و سقطی (۱۳۷۳) مطابقت دارد.

جدل ۱- مقایسه میانگین ترکیبات شیمیایی موجود در مغز واریته‌های بادام زمینی (درصد) قبل از تلقیح با کپک

واریته	چربی	پروتئین	خاکستر	رطوبت	قند احیا کننده	اسید اولئیک	اسید لینولئیک
هندی	۵۱/۲۶±۰/۰۸^{a}	۲۰/۰۲±۰/۱۹^{c}	۲/۴۳±۰/۰۴^{a}	۳/۵۶±۰/۴۷^{a}	۴/۵۳±۰/۱۷^{a}	۴۳/۱۶±۱/۲۱^{d}	۳۶/۸۴±۲/۴^{a}
چینی	۴۸/۴۶±۰/۰۵^{b}	۲۰/۵۱±۰/۳۲^{c}	۲/۳۳±۰/۰۷^{ab}	۳/۴۴±۰/۱۲^{a}	۳/۵۶±۰/۳۴^{c}	۴۵/۹۳±۰/۵۵^{c}	۳۶/۵۱±۱/۳۲^{a}
محلی	۴۴/۷۷±۰/۲۵^{d}	۲۴/۲۸±۰/۲۵^{a}	۱/۹۸±۰/۰۳^{c}	۳/۴۴±۰/۰۷^{a}	۴/۰۵±۰/۰۴^{b}	۵۹/۳۳۱±۱/۲۸^{a}	۲۵/۱۹±۱/۲۱^{b}
گلی	۴۵/۱۳±۰/۱۹^{c}	۲۳/۴۲±۰/۲۱^{b}	۲/۲۶±۰/۰۳^{b}	۳/۳۳±۰/۶۳^{b}	۴/۴۱±۰/۶^{a}	۵۸/۰۹±۲/۰۱^{b}	۲۵/۴۴±۱/۰۵^{b}

حروف مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

میزان حساسیت ارقام مختلف بادام‌زمینی به جدایه قارچ *A.flavus* آفلاتوکسین‌زا

برای ارزیابی حساسیت ارقام بادام زمینی به رشد *A. flavus*، میانگین درصد تشکیل پرگنه قارچ مذکور بر روی مغز نمونه‌های بادام‌زمینی بر اساس سطح پرگنه شده و میزان اسپور تولیدی در طی هشت روز پس از تلقیح مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). همانطور که مشاهده می‌شود بین میانگین درصد تشکیل پرگنه واریته‌های مختلف در پایان روز اول و دوم، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد اما در روز سوم، در واریته هندی به نحو معنی‌داری به مراتب بیشتر از واریته‌های دیگر است و در نهایت از روز چهارم، میانگین درصد تشکیل پرگنه واریته هندی به میزان ۱۰۰ درصد می‌رسد. میانگین درصد تشکیل پرگنه در واریته چینی تنها در روز سوم با واریته هندی دارای اختلاف معنی‌دار بود و در روزهای دیگر با وجود کمتر بودن میزان کلنیزاسیون واریته چینی از واریته هندی این اختلاف، معنی‌دار نبود. همچنین اختلاف در میانگین درصد تشکیل پرگنه واریته چینی با واریته‌های گلی و محلی از روز سوم به بعد کاملا معنی‌دار بود.

واریته‌های گلی و محلی در پایان روز اول تا پایان روز ششم، اختلاف معنی‌داری نداشتند و از روز هفتم این اختلاف مشاهده شد به نحوی که تشکیل پرگنه بر روی واریته محلی به طور معنی‌داری بیشتر از واریته گلی بود. در مرحله بعد، پس از رشد قارچ بر روی مغز بادام‌زمینی ارقام مختلف، میزان اسپور تولید شده هر واریته محاسبه گردید. همانطور که انتظار می‌رفت در ارقامی که *A. flavus* رشد بیشتری در سطح مغز بادام‌زمینی داشت، میزان اسپورزایی آن نیز بیشتر بود. واریته هندی بیشترین و واریته گلی کمترین میزان اسپور تولیدی را داشتند (جدول ۳). با توجه به میزان تشکیل پرگنه و تعداد اسپور تولیدی، می‌توان نتیجه گرفت که از بین واریته‌های مورد بررسی، واریته‌های گلی و محلی به ترتیب مقاوم‌ترین و واریته‌های هندی و چینی به ترتیب حساس‌ترین واریته‌های بادام زمینی در برابر هجوم *A. flavus* به شمار می‌آیند (شکل ۱). پس از محاسبه میزان اسپور تولیدی، در بخش دیگری از این پژوهش، میزان تولیدآفلاتوکسین B_1 پس از هشت روز نگهداری نیز تعیین شد (جدول۳). بر اساس نتایج بدست آمده، در رقم هندی که بالاترین میزان حساسیت به کپک *A. flavus* را داشت، بیشترین میزان آفلاتوکسین B_1 تولید شد در حالی‌که در واریته گلی که مقاوم‌ترین واریته بود کمترین میزان آفلاتوکسین تولید گردید. با توجه به اینکه *A. flavus*، طیف وسیعی از محصولات کشاورزی را مورد حمله قرار می‌دهد، یکی از موثرترین و مهم‌ترین راه‌حل‌هایی که به کمک آن می‌توان بر این معضل فائق آمد، بررسی میزان مقاومت و یا به عبارت دیگر حساسیت ارقام مختلف یک محصول و انتخاب مقاوم‌ترین ارقام نسبت به رشد این کپک و بالطبع آفلاتوکسین تولیدی ناشی از رشد آن می‌باشد (Ghewande و همکاران،۱۹۹۳). نتایج این پژوهش همانند نتایج Asis و همکاران (۲۰۰۵)، Gradziel و همکاران (۱۹۹۴)، Ghewande و همکاران (۱۹۹۳) و محمدی مقدم (۱۳۷۸) نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان رشد *A. flavus* بر روی مغز دانه‌های روغنی ارقام مختلف و اسپور تولیدی از آن‌ها وجود دارد و میانگین درصد تشکیل پرگنه بر روی ارقام مقاوم‌تر به مراتب کمتر و متعاقبا دارای اسپور و همچنین آفلاتوکسین تولیدی کمتری هستند. بر اساس نتایج جداول ۱، ۲ و ۳، واریته گلی با مقاومت بالاتر، بطور معنی‌داری دارای میزان پروتئین و اسید اولئیک بیشتر و همچنین میزان چربی و اسید لینولئیک کمتر و واریته هندی با مقاومت کمتر، دارای میزان چربی و اسید لینولئیک بیشتر و همچنین مقدار پروتئین و اسید اولئیک کمتری بود. Shi-hua و همکاران (۲۰۰۶)، نشان دادند که واریته‌های بادام‌زمینی با مقاومت بالا نسبت به رشد *A. flavus* دارای پوسته‌ای با لایه مومی ضخیم و لایه اپیدرمی یکپارچه و محکم‌تری هستند و در عوض، پوسته دانه‌های با حساسیت زیادتر دارای لایه مومی با ضخامت کمتر و لایه اپیدرمی نرم‌تری می‌باشند. این محققین در ادامه اعلام کردند که بین مواد ذخیره‌ای موجود در بادام زمینی با مقاومت آنها در برابر کپک *A. flavus* ارتباط معنی‌داری وجود دارد. بطوریکه واریته‌های با مقاومت بالاتر دارای اسید اولئیک و پروتئین بیشتری هستند و در عوض واریته‌های با حساسیت بالاتر، دارای چربی و اسید لینولئیک بیشتری هستند. Burow و همکاران (۲۰۰۰) نیز دریافتند که بادام زمینی‌های با مقاومت بالاتر نسبت به نفوذ *A. flavus*، دارای اسید اولئیک بیشتری می‌باشند، بنابراین نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابق با نتایج سایر محققین می باشد

جدول۲- مقایسه میانگین درصد تشکیل پرگنه *A. flavus* بر روی ارقام مختلف بادام‌زمینی در طی ۸ روز نگهداری

واریته	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم	روز هشتم
هندی	۲/۰۰۳±۱/۶۴^{a}	۵/۱۸±۱/۹۹^{ab}	۹۵/۹۶±۴/۹۴^{a}	۱۰۰±۰^{a}	۱۰۰±۰^{a}	۱۰۰±۰^{a}	۱۰۰±۰^{a}	۱۰۰±۰^{a}
چینی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۹/۳۱±۲/۸۱^{a}	۵۱/۰۴±۵/۸۴^{b}	۸۵/۰۳±۴/۷۲^{a}	۹۱/۵۸±۱/۲۱^{a}	۹۵/۲۱±۱/۲۱^{a}	۹۵/۲۱±۱/۲۱^{a}	۹۵/۲۱±۱/۲۱^{a}
محلی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۱/۵۵±۱/۰۷۲^{b}	۲۱/۴۸±۵/۶۸^{bc}	۵۱/۶۷±۷/۱^{b}	۶۷/۴۱±۷/۹۱^{b}	۷۸/۵۵±۶/۹۵^{b}	۸۷/۸۴±۷/۵۸^{b}	۸۹/۶۰±۷/۳^{b}
گلی	۰/۴۷±./۱۸^{a}	۲/۶۵±۲/۱۱^{b}	۱۸/۶۶±۴/۴۹^{c}	۶۶/۷±۵/۱۸^{b}	۷۴/۸۹±۶/۶۲^{b}	۷۴/۸۹±۶/۶۲^{b}	۸۰/۶۶±۶/۶۴^{c}	۸۱/۶۱±۷/۰۵^{c}

حروف مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول۳- مقایسه میزان اسپور و آفلاتوکسین قبل از تلقیح و پس از گذشت هشت روز از تلقیح با *A. flavus* در ارقام مختلف بادام زمینی

ارقام بادام زمینی	میزان اسپور قبل از تلقیح	میزان اسپور در هر میلی لیتر بعد از تلقیح (log_{10})	میزان آفلاتوکسین قبل از تلقیح (ppb)	میزان آفلاتوکسین بعد از تلقیح (ppb)
هندی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۷/۹۷±۶/۳^{a}	۰/۰۰۰±۰^{a}	۴۴۶/۱۲±۱۹/۵۵^{a}
چینی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۷/۵۸±۶/۳۲^{b}	۰/۰۰۰±۰^{a}	۳۸۹/۹۳±۵/۶۹^{b}
محلی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۷/۰۹±۵/۹۶^{c}	۰/۰۰۰±۰^{a}	۳۵۴/۲۳±۱۰/۲^{b}
گلی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۶/۸۲±۵/۹۲^{d}	۰/۰۰۰±۰^{a}	۲۷۴/۳±۱۶/۷۳^{c}

حروف مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

شکل ۱- میزان رشد کپک *A. flavus* بر روی سطح نمونه‌های بادام‌زمینی واریته‌های هندی (سمت راست) و گلی (سمت چپ) در پایان ۸ روز گرمخانه‌گذاری.

تاثیر کپک *A. flavus* بر اسیدهای چرب اولئیک، لینولئیک و عدد پراکسید روغن بادام‌زمینی

یکی از اهداف مهم این پژوهش، بررسی تاثیر رشد کپک *A. flavus* بر روی مقدار پراکسید و اسیدهای چرب روغن بادام زمینی بود. نتایج حاصل از تعیین عدد پراکسید در جدول ۴ آورده شده است. پراکسید روغن بادام‌زمینی اولیه در دامنه تعریف شده استاندارد ایران (شماره ۱۴۴) قرار داشت اما پس از تلقیح اسپور و رشد کپک، پراکسید روغن بادام‌زمینی همراه با ریسه‌های کپک بطور معنی‌داری در واریته‌های هندی و چینی افزایش یافت. در حالی‌که با جداسازی ریسه‌های کپک، میزان پراکسید در تمام واریته‌ها نسبت به زمانی که پراکسید در حضور ریسه‌های کپک اندازه‌گیری شده بود کاهش یافت. بر اساس نتایج بدست آمده با رشد کپک بر روی مغز بادام‌زمینی، اسید اولئیک و لینولئیک موجود در روغن واریته‌های مختلف به شکل معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۵). Calvo و همکاران (۱۹۹۹)، با بررسی نقش اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک در رشد *Aspergillus* دریافتند که کپک مذکور دارای ژنی است که توانایی تبدیل اسید اولئیک به اسید لینولئیک را دارد و با ایجاد جهش در آن، میزان تولید اندام‌های کپک کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج Calvo و همکاران (۱۹۹۹)، در فیلامنت‌های کپک *Aspergillus*، مولکول‌های مشتق شده از اسید لینولئیک که فاکتورهای Psi نامیده می‌شوند تولید اندامک‌های جنسی و غیرجنسی را بر عهده دارند. فاکتورهای Psi مخلوطی از ۳ مولکول اسید هیدروپراکسی لینولئیک با نام‌های Psi $A1_\alpha$، Psi $B1_\alpha$ و Psi $C1_\alpha$ هستند که ترکیب اول، تولید اندامک‌های غیرجنسی و دو ترکیب دیگر تولید اندامک‌های جنسی را بر عهده دارند. Torres و همکاران (۲۰۰۰)، میسیلیوم‌های رشد یافته *A. flavus* بر روی تخم آفتابگردان را جدا کرده و پس از شستشو با حلال‌های دارای مقادیر قطبیت متفاوت، آن‌ها را در ایزواکتان حاوی اسید اولئیک و ۱- پروپانول، یا ۱- پروپانول به تنهایی به حالت سوسپانسیون در آوردند. پروپیل اولئات و پروپیل لینولئات در تمام موارد پس از ۲۴ ساعت، افزایش یافت. محققین مذکور دلیل این افزایش را حضور اسیدهای چرب روغن آفتابگردان بیان نمودند که کپک برای رشد خود از آن‌ها استفاده کرده است. این محققین اظهار داشتند که اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک پس از اکسیداسیون به شکل هیدروپراکسید توسط *A. flavus* برای تولید اندامک‌های جنسی و غیرجنسی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طرفی Kiatsimkul و همکاران (۲۰۰۶)، نشان دادند آنزیم لیپاز به دست آمده از *Aspergillus niger* می‌تواند به‌طور انتخابی اسیدهای چرب اشباع روغن سویا را هیدرولیز کند. Sariyar و همکاران (۲۰۰۳)، با تحقیق بر روی فندق دریافتند که *A. flavus* توانایی تولید لیپاز را داشته و از طریق فعالیت لیپازی خود قادر است تری اسیل گلیسرول را هیدرولیز و اسیدچرب آزاد تولید نماید. همچنین تولید آفلاتوکسین توسط این کپک بعنوان یک کاتالیزور، موجب افزایش تولید آنزیم لیپاز می‌شود (Chaudhry، ۱۹۹۶). در این پژوهش نیز با افزایش مقدار تشکیل پرگنه در سطح مغز بادام‌زمینی، میزان پراکسید در روغن استخراج شده از بادام‌زمینی همراه با ریسه‌های کپک، افزایش و میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک، کاهش یافت. از طرفی میزان پراکسید در روغن استخراج شده از بادام‌زمینی پس از جداسازی ریسه‌های کپک، کاهش پیدا کرد که می‌تواند به علت جذب ترکیبات هیدروپراکسید توسط ریسه‌های کپک برای تولید اندامک‌های جنسی و غیرجنسی باشد (Torres و همکاران، ۲۰۰۰).

جدول ٤- مقدار پراکسید تولید شده (meq/kg) در روغن نمونه‌های بادام‌زمینی همراه با ریسه‌های کپک و پس از جداسازی ریسه‌های کپک در پایان هشت روز پس از تلقیح کپک *A. flavus*

واریته	پراکسید نمونه‌های شاهد	پراکسید همراه با ریسه‌کپک	پراکسید پس از جداسازی ریسه کپک
هندی	۱/۹۹۸±۰/۰۰۲^{c}	۲۲/۱۰۵^{a}	۰/۰۴^{d}
چینی	۱/۸۸۶±۰/۰۰۸^{c}	۶/۹۳۲^{b}	۰/۰۴^{d}
گلی	۱/۸۲±۰/۰۵^{c}	۳/۸۶۸^{c}	۰/۰۰^{d}
محلی	۱/۹۲۶±۰/۰۳^{c}	۲/۹۳۸^{c}	۰/۰۰^{d}

حروف مشابه در هر ستون و همچنین حروف مشابه ستون‌های دوم با سوم (Standard Error=0.55) و ستون‌های سوم با چهارم (Standard Error=0.0291) نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول۵- تاثیر تلقیح کپک *A. flavus* بر میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک در پایان هشت روز پس از تلقیح کپک

اثر متقابل (واریته- اسپور)	اسید اولئیک٪	اسید لینولئیک٪
واریته محلی [۱]	۵۷/۳۹۱^{a}	۲۱/۲۰۸^{cd}
واریته گلی [۱]	۵۶/۱۸۸^{a}	۲۳/۵۰۷^{c}
واریته هندی [۱]	۴۰/۵۵۹^{de}	۳۴/۴۵۴^{a}
واریته چینی [۱]	۴۲/۶۹۱^{cd}	۳۳/۴۹۹^{ab}
واریته محلی [۲]	^{b}۵۳/۸۲	^{e}۱۵/۶۷۵
واریته گلی [۲]	^{b}۵۱/۱۹۹	^{de}۱۷/۶
واریته هندی [۲]	۳۶/۶۶۳^{e}	۲۹/۰۷۵^{b}
واریته چینی [۲]	۳۲/۰۷۶^{f}	۲۰/۹۸۷^{cd}
	Standard Error = 1.304	Standard Error = 1.106

حروف مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد (۱= نمونه‌های شاهد و ۲= نمونه‌های تلقیح شده با اسپور).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تلقیح *A. flavus* به واریته‌های رایج بادام‌زمینی استان گلستان، منجر به تغییر میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک و همچنین اندیس پراکسید می‌گردد. به نحوی که با افزایش میزان کلنیزاسیون این کپک در سطح مغز بادام‌زمینی، میزان پراکسید در روغن استخراج شده از آن، افزایش و میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک، کاهش یافت.

همچنین در بین واریته‌های بادام‌زمینی مورد بررسی در این پژوهش، واریته گلی و واریته هندی به ترتیب کمترین و بیشترین حساسیت را به *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین B_1 دارا بودند. علاوه بر این، واریته گلی با مقاومت بالاتر، بطور معنی‌داری دارای میزان پروتئین واسید اولئیک بیشتر و همچنین میزان چربی و اسید لینولئیک کمتر و واریته هندی با مقاومت کمتر، دارای میزان چربی و اسید لینولئیک بیشتر و همچنین مقدار پروتئین و اسید اولئیک کمتری بود.

منابع

AOAC. 2000. Official methods of analysis, Association of official analytical chemist. EUA.

Asis, R., Barrionuevo, D. L., Giorda, L. M., Nores, M. L., & Aldao, M. A. 2005, Aflatoxin production in six peanut genotypes infected with A. flavus and A. parasiticus, isolated from peanut production area of Cordoba Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9274-9280.

Brown, A. 2012, Situation and outlook. In: 2012 Peanut Information, Borth Carolina State University Coop. Ext. Ser. *Publication* AG-331, pp. 4-5.

Calvo, A. M., Hinze, L. L., Garner, H. W., & Keller, N. P. 1999, Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of Aspergillus spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3668-3673.

Calvo, A. M., Garner, H. W., & Keller, N. P. 2001, Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in Aspergillus nidulans. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 25766-25774.

Cunningham, S. C., Vasavada, P. C., Deak, T., & Fung, D. 2006. Rapid detection of mycotoxigenic molds and mycotoxins in fruit juice. J. ARI The Bulletin of the Istanbul Technical University, 54(4), 28-38.

Chaudhry, Z. 1996, Effect of aflatoxicosis on chich muscle, fat and bone growth and possible reversal of aflotoxicosis

by nandrolome decanoate. PhD Thesis. Punjab university.
Danehower, D., & York, A. C. 2012, Interactions of agrochemicals applied to peanut; part 2: Effects on fungicides. *Journal of Crop Protection*, 41,143-149.
Ghewande, M. P., Nagaraj, G., Desai, S., & Narayan, P. 1993, Screening of groundnuts bold seeded genotypes for resistance to A. flavus seed colonization and less aflatoxin production. *Seed Science and Technology*, 21, 45-51.
Gradziel, T. M., & Wang, D. 1994, Susceptibility of California almond cultivars to aflatoxigenic Aspergillus flavus. *Hort Science*, 29, 33-35.
Hoskisson, P. A., Hobbs, G., & Sharples, G. P. 2000, Response of Micromonospora (NCIMB 12744) spores to heat treatment with evidence of a heat activation phenomenon. *Letters Applied Microbiology*, 30, 114-117.
International Crops Research Instiute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). 2004.
Institute of standards and industrial research of Iran. 1983. Hydrogeneated vegetable oils. Revised 5th Edition. *ISIR number*: 144.
Institute of standards and industrial research of Iran. 2008. Foods and agricultural products Method of sampling for official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. ISIR number: 12004.
Islamic republic of Iran ministry of agriculture-jahad. Department of Statistics and Information, 2007.
Kiatsimkul, P. P., Sutterlin, W. R., & Suppes, G. J. 2006, Selective hydrolysis of epoxidized soybean oil by commercially available lipases: effect of epoxy group on the enzymatic hydrolysis. *Molecular Catalysis* B: enzymatic, 41(1-2), 55-60.
Klich, M. A., Samson, R. A., & members of the international commission on Penicillium and Aspergillus. 2006, Aspergillus reference cultures.
Leszczynska, J., Maslowska, J., Owczarek, A., & Kucharska, A. 2001, Determination of aflatoxins in food products by ELISA method. *Journal of Food Science*, 19(1), 8-12.
Li, P., Zhang, Q., & Zhang, W. 2009, Immunoassays for aflatoxins. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(9), 1115-1126.
Mohammadi Moghadam, M. 1999. Assessment of Sensitivity Level of Pistachio Cultivars To aflatoxigenic Aspergillus Flavus and evaluation of amount of aflatoxin B1 production. *Master's thesis,* Tarbiat Modarres University, 144 pp.
Nagarajan, V., & Remesh, V. B. 1992, Aflatoxin production in peanut varieties by A.flavus link and A.parasiticus speare. *Journal of Applied Microbiology*, 25(2), 319-321.
Rai, M. K., Bonde, S. R., Ingle, A. P., & Gade, A. K., 2012, Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety. Pharmaceutical Education and Research, 3(1), 22-34.
Shi-hua, S., Hai-xia, W., Chun-juan, L., Shu-bo, W., Hong-tao, L., & Guo-young, J. 2006, Research of seed testa structure and storage material of peanut germplasm with different resistance to A.flavus. *Agricultural Sciences in China*, 5(6):478-482.
Sariyar, L., & Heperkan, D. 2003, The role of A. flavus and A. niger in the hydrolysis of hazelnut fat. *Journal of Food science & Technology*, 38(4), 487-492.
SAS. 2003, SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition.SAS Institute, Cary, NC, USA.
Torres, M., Emerson, B., Loscos, V., & canela, R. 2000, Lipase activity of resting cells of Aspergillus from endogenous substrate arising from the original growth medium. *Biotechnology Letters*, 22(15), 1265-1268.
Seghti, M. 1994, Evaluation of food and Medicinal value of a variety of peanuts in the Iran market. *Master's thesis*, Tarbiat Modarres University, 132pp.
United States Department of Agriculture (USDA) 2002, Aflatoxin handbook. USDA nutrient data base for standard reference.
Wen Sun, D. 2008, Modern techniques for food authentication. University College Dublin. P: 476-520.
Zamora, R., & Hidalgo, F. 2004, Fatty acids, In: Food Analysis. Eds. Nalet, L. M. L. CRC press. P: 221-261.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 394-402

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۰۲-۳۹۴

Evaluation of the effect of *Aspergillus flavus* inoculation on fatty acids, proxide value and aflatoxin production in four common varieties of peanut cultivated in Golestan province

M. Ebrahimi[1]- M. Khomeiri[2*]- Y. Maghsodlo[3]

Received: 2014.04.13
Accepted: 2014.10.04

Introduction: Toxigenic fungi such as *A. flavus* grow widely in peanut and produce aflatoxins, a group of carcinogenic metabolites. Aflatoxin produced in peanut differed from the genetic variety of plant. The high humidity and moderate temperatures in the subtropical Caspian littoral of northern Iran could increase the growth of *A. flavus* and the production of aflatoxin. The objectives of this study were 1) to determine the chemical composition of peanut cultivars grown in Golestan Province, Iran, 2)to select resistant variety of peanut to aflaoxigenic *A. flavus growth* and 3) to evaluate relationship between *A. flavus* growth and changes in oleic and linoleic acid content and peroxide value.

Materials and method: Peanut samples were used from four important varieties of peanut, Goli, Mahalli, China and India. those have been harvested from farms in Golestan province, Iran. Fat, protein, ash, moisture, reducing sugar, AFB_1 content and peroxide value in each sample were measured by the standard method of AOAC. Fatty acids of the peanut seed oil were analyzed using gas chromatography (GC, Varian CP-3800 model) with a flame ionization detector (FID) and a DB-WAX column (50 m × 0.32 mm ×0.2 µm). To study the effects of *A. flavus* on peanut varieties, they were sterilized with 0.5% NaClO solution and then one ml of *A. flavus* spore suspension was added to every 20gr disinfected peanut and was placed in the incubator for eight days at 26°C. After incubation, the number of seeds colonized by fungi, spore production, AFB_1 production, the association between colonization rate of hydrolysis of fatty acids and peroxide value were determined.

Results and Discussion: The results showed that there were significant differences ($P<0.05$) in the oil, moisture, protein, ash, reducing sugar, oleic acid and linoleic acid content between peanut varieties. Average values for the main constituents of peanuts are the following: (oil: 44.77-51.26% , moisture: 3.33-3.56%, protein: 20.02-24.28%, Ash: 1.98-2.43%, reducing sugar: 3.56-4.53%, oleic acid: 43.16-59.33% and linoleic acid: 25.19-36.84%).

In order to study the susceptibility of peanut varieties to aflatoxigenic, *A.flavus* growth, colonization rate, aflatoxin B_1 and spore production on peanut kernels were evaluated at the end of 8 days of incubation. The results showed that there were also significant differences ($P<0.05$) between the colonization rates for different peanut varieties at the eighth day of inoculation. The India and China varieties had the highest colonization rates, at 100 and 95.21%, respectively. The Goli and Mahali varieties had the lowest colonization rates, at 81.61 and 89.6%, respectively. Furthermore, at the end of the eighth day of inoculation, *A. flavus* had covered the India and China varieties completely, but had covered the Goli and Mahali varieties only slightly. For this reason, additional experiments evaluated the content of spore production with a haemocytometer. It was observed that the Goli variety had the minimum spore production, and the India variety had the maximum spore production. Therefore, it can be said that the India variety was most susceptible to the *A. flavus*, followed by (in descending order) the China, Goli and Mahali varieties. Dissimilarity in host resistance to aflatoxigenic *A. flavus* is due to difference in host genotype. One of the strategies to decrease the risk of aflatoxin contamination is the cultivation of genotypes with resistance to *Aspergillus* infection. Some factors found to be associated with resistance to seed colonization by aflatoxigenic *A. flavus* are cell structure, cell arrangement, permeability, wax layer and tannin content, fatty acid and amino-acid peanut components.

In another part of the study, the production of aflatoxin was assessed. Results indicated that the India (highest sensitivity to mold) and Goli (least sensitivity to mold) varieties were contained the maximum and minimum aflatoxin content, respectively. Results also showed that growth of *A. flavus* on peanut increased the proxide

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Agriculture Science and Natural Resources university of Gorgan, Gorgan, Iran.
2- Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture Science and Natural Resources university of Gorgan, Gorgan, Iran.
3- Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture Science and Natural Resources university of Gorgan, Gorgan, Iran.
(*Corresponding Author Email: mkhomeiri@yahoo.com)

value whereas decreased oleic and linoleic acid content. *A. flavus* hydrolyzes oil when grown on the oil medium and produces free fatty acid. *Aspergillus* uses of free fatty acid (oleic and linoleic acid) in form of hydroperoxy for production of sexual and asexual bodies. Therefore with production of hydroperoxy molecules increase proxide value and decreased oleic and linoleic acid content in the oil peanut that extracted of peanut with mycelium.

Conclusion: Linoleic acid and fat content had significant relationship with *A. flavus* growth and AFB1 production. it seems, it is possible to control the *A. flavus* growth and AFB_1 production by Choosing varieties that have less acid linoleic and fat content.

Keywords: *Aspergillus flavus*, Direct competitive ELISA, Gas chromatography, Aflatoxin B_1.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 403-414

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۱۴-۴۰۳

بررسی تأثیر رقم، اسمز، بسته‌بندی و دمای نگهداری بر ویژگی‌های کمی و کیفی برگه‌ی خربزه

شهره نیکخواه[۱]- ناصر صداقت[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۱۵

چکیده

در تحقیق حاضر تاثیر انواع روش‌های بسته‌بندی و دمای نگهداری برخصوصیات کمی و کیفی برگه‌ی خربزه مورد مطالعه قرار گرفت. از ارقام تاشکندی و خاتونی میوه خربزه، محلول اسمزی صفر و ۱۰درصد ساکارز و خشک‌کن کابینتی برای تهیه برگه استفاده شد. برگه‌های تولیدی با دو روش تحت اتمسفر تغییر یافته (با فیلم دولایه PE-PA با ضخامت ۸۵ میکرون، دو ترکیب گازی: ۷۰ درصد دی‌اکسیدکربن، ۳۰ درصد نیترژن (اتمسفر۱) و۶۰ درصد دی‌اکسیدکربن، ۴۰ درصد نیترژن (اتمسفر۲)) و بدون تغییر در اتمسفر (با دو فیلم پلی‌اتیلن و پلی‌استایرن) بسته‌بندی و در ۲ دمای ۲۵°C و ۴°C نگهداری شدند. پس از ۶ ماه انبارمانی، ماکزیمم نیروی وارده بر بافت برگه‌ی خربزه درتیمار اسمزی ۱۰درصد نگهداری شده در ۴°C ، نسبت به تیمارهای دیگر کمتر بود. برگه‌ی نگهداری شده در دمای ۴°C دارای میزان روشنی (L*) و زردی (b*) بیشتر بود. برگه‌ی پیش تیمار شده با محلول ۱۰ درصد و بسته‌بندی شده با اتمسفر ۲ دارای حداقل میزان قرمزی (a*) بود. برگه‌ی پیش تیمار شده با محلول ۱۰درصد اسمزی، بسته‌بندی شده در اتمسفر ۲ و نگهداری شده در ۴°C دارای حداقل میزان اکسیژن و حداکثر میزان دی اکسیدکربن در بسته بود. با توجه به نتایج مشخص شد که برگه‌ی خربزه رقم تاشکندی پیش تیمار شده با محلول ۱۰درصداسمزی، بسته‌بندی شده در اتمسفر ۲ و نگهداری شده در ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به سایر تیمارها، در مدت نگهداری خصوصیات کمی و کیفی خود را بیشتر حفظ نموده بود.

واژه‌های کلیدی: اتمسفر تغییر یافته، اسمز، ارقام خربزه، خشک‌کردن، کیفیت

مقدمه

برگه‌ی خربزه به‌عنوان یک ماده تنقلاتی با خواص تغذیه‌ای زیاد می‌تواند مورد استفاده فراوان قرار بگیرد. خربزه حاوی قندهای گلوکز و فروکتوز؛ پتاسیم ؛ ویتامین‌های A، B_1، B_2، PP، C و سلولز می‌باشد (Souci *et al*,2000).

در روش آبگیری اسمزی از یک حلال یا یک محلول حاوی قند یا نمک برای حذف آب از محصول استفاده می‌شود(Doymaz, 2004). فرآیند اسمزی به‌عنوان یک پیش تیمار در بسیاری از فرآیندها سبب بهبود خصوصیات تغذیه‌ای، حسی و عملکردی مواد غذایی می‌شود (Ade – Omowaye *et al*, 2002).

در تحقیقی طالبی و خربزه با دو نوع محلول قندی (ساکارز و مخلوط ۱:۱ ساکارز -گلوکز با غلظت ۶۰ درصد)، محلول کربنات-کلسیم و دو نوع طعم دهنده (هل و گلاب) تیمار شده و با استفاده از دستگاه خشک کن با هوای داغ، خشک و سپس در ظروف پلی‌اتیلنی بسته‌بندی شدند. نتایج نشان داد که استفاده از محلول‌های مختلف قندی سبب کاهش مقدار رطوبت نمونه‌ها طی زمان نگهداری شد. نوع محلول قندی اثری بر pH نداشت. فعالیت آب نمونه‌های طالبی طی نگهداری در حضور هر دو نوع محلول قندی کاهش یافت. نمونه‌های آبگیری شده در محلول قندی (ساکارز-گلوکز) دارای عطر، طعم، بافت و پذیرش کلی بهتری نسبت به نمونه‌های دیگر بودند (گنجلو،۱۳۸۴ ؛ گنجلو، ۱۳۸۶). ارزیابی خصوصیات کیفی غذاهای خشک شده را می‌توان به ۴ گروه تقسیم کرد: خواص میکروبی، خواص شیمیایی، خواص فیزیکی و تغذیه‌ای(Rahman, 2007).

پارامترهایی که بر روی بافت محصول تاثیرگذارند عبارتند از: محتوای رطوبت، ترکیبات، رقم یا گونه، pH، پیشینه محصول (رسیدگی و سن محصول) و ابعاد نمونه(Rahman, 2007). بافت یک محصول به روش خشک‌کردن و تیمار آن وابسته می‌باشد(صفری،۱۳۸۴).

فعالیت آب مقیاسی برای نشان دادن وضعیت انرژی آب در یک سیستم و بنابراین مقیاسی از آب در دسترس برای رشد میکروبی است. برگه میوه‌ها و آجیل‌ها که اغلب در یک گروه قرار می‌گیرند، فرآورده‌های طبیعی هستند که باید دارای رطوبت متعادل باشند.

۱- مربی پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، خراسان رضوی
۲-دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email:sedaghat@yahoo.com)

فعالیت آبی کمتر از ۰/۶ به این معنی است که هیچ میکروارگانیسمی قادر به رشد نخواهد بود. در فعالیت آبی ۰/۶ که معمولا در میوه های خشک با ۱۵ تا ۲۰ درصد رطوبت مشاهده می‌شود، فقط کپک‌های اسموفیلیک و تعداد محدودی قارچ قادر به رشد هستند. در فعالیت آبی کمتر، هیچ میکروارگانیسمی قادر به رشد نیست (Rahman, 2007).

در بیشتر مواقع غذاهای خشک قبل از پختن و یا مصرف کردن در آب خیسانده می‌شوند، بنابراین آبگیری مجدد یکی از مهمترین معیارهای ارزیابی کیفی محصولات خشک تلقی می‌شود (Rahman &Perera,1999؛ Lewiki,1998a؛Lewiki,1998).

واکنش‌های قهوه‌ای شدن سبب تغییرات رنگ، کاهش ارزش تغذیه‌ای و حلالیت‌پذیری، ایجاد بدطعمی شده و در نتیجه تغییرات نامطلوب بافتی را به دنبال خواهد داشت. واکنش‌های قهوه‌ای شدن را به ۲ گروه آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌کنند. به دلیل حرارت دیدن ماده‌غذایی و خشک‌شدن آن اصولا واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی در محصول خشک رخ نخواهد داد و در مورد میوه‌های خشک بیشترین علت قهوه‌ای شدن، واکنش قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی میلارد می‌باشد (قنبرزاده،۱۳۸۴؛ شهیدی و همکاران،۱۳۹۰).

ترکیب هوا را ۷۸ درصد ازت، ۲۱ درصد اکسیژن و مابقی را گازکربنیک و گازهای دیگر تشکیل می دهند. با افزایش متناسب دی‌اکسید کربن و یا کاهش اکسیژن، زمان ماندگاری طولانی می‌شود (Fellows, 1990؛Aaron,1997)

جهت تغییر اتمسفر از دو روش استفاده می‌شود که عبارتند از: جایگزینی هوا با گاز یا مخلوط گاز و ایجاد اتمسفر درون بسته با استفاده از تغییردهنده‌های مناسب مانند جذب‌کننده های اکسیژن و یا تولیدکننده‌های دی‌اکسیدکربن (تاج الدین،۱۳۸۰).

بسته‌بندی تحت اتمسفرتغییر یافته، عمر انباری بیشتر فرآورده‌ها را افزایش می‌دهد. اکسیژن سبب اکسایش مواد غذایی می‌شود و برای رشد میکروارگانیسم‌های هوازی لازم است. اکسیژن باید از بسته خارج گردد اما میزان آن در بسته باید در حد کنترل شده باشد. در این بسته‌بندی از یک گاز بی‌اثر مانند نیتروژن بعنوان جایگزین اکسیژن (عامل اصلی فساد فرآورده) استفاده می‌گردد. معمولا میزان اکسیژن در بسته‌بندی با اتمسفر تغییر یافته برای میوه‌های خشک باید کمتر از ۱۰ درصد باشد. دی‌کسیدکربن مانع از رشد اکثر باکتری‌های هوازی و مخمرها می‌شود. معمولا هر چه میزان این گاز بیشتر باشد، عمر انباری بیشتر خواهد شد. اما از آنجایی که دی‌اکسیدکربن توسط چربی و آب قابل جذب است، لذا اکثر فرآورده‌ها آن را جذب خواهند کرد. مقادیر اضافی دی‌اکسیدکربن در بسته بندی با اتمسفر تغییر یافته می‌تواند سبب ایجاد بوی نامطبوع، از دست رفتن آب و اضمحلال بسته‌بندی شود. بنابراین ایجاد تعادل بین عمر انباری مطلوب از نظر تجاری و میزان که از اثرات نامطلوب دی‌اکسیدکربن می‌توان چشم‌پوشی نمود، دارای اهمیت است. حداقل غلظت ۲۰ درصد از دی‌اکسیدکربن، برای کنترل رشد باکتری و مخمر توصیه می‌شود (Paine, 1992).

در نگهداری کوتاه مدت خشکبار استفاده از بسته‌بندی با اتمسفر تغییر یافته مقرون به صرفه نمی‌باشد اما در صورت نگهداری طولانی‌تر از ۲ تا ۶ ماه، این فرآورده‌ها هم باید در مقابل اکسیژن محافظت گردند. میزان اکسیژن باقیمانده در بسته در حد ۲ تا ۳ درصد مناسب است. برای بسته‌بندی این فرآورده‌ها باید از خلاء و یا تزریق گاز استفاده نمود. برای دانه‌های آجیلی استفاده از دی اکسیدکربن پیشنهاد شد. جذب دی‌اکسیدکربن توسط فرآورده خشک شده، ایجاد خلاء می‌نماید. پدیده جذب مشابه با آنچه در زغال چوب رخ می‌دهد، می‌باشد و این پدیده می‌تواند در تعدادی از غلات، دانه‌های روغنی، بقولات، برنج و ذرت هم استفاده شود. بطور مثال در پکان[1] عمر انباری از ۲ تا ۴ هفته در هوای محیط، با استفاده از این بسته بندی به ۲۷ هفته رسید (Ooraikul&Stiles,1990).

اندازه‌گیری میزان گاز در قسمت بالای بسته‌بندی با اتمسفر تغییر یافته برای اطمینان از بدون درز بودن بسته‌بندی و برای اطمینان از دقیق بودن میزان گازهای موجود در بسته است(Systech).

بر اساس بررسی‌های بعمل آمده، مشخص شد که تاکنون تحقیق مدونی در خصوص خشک‌کردن خربزه، نگهداری و بسته‌بندی برگه‌ی خربزه انجام نشده و یا در دسترس نبود. مشخص شده است که ارقام خاتونی و درگزی (تاشکندی) بالاترین سطح زیر کشت را در استان خراسان رضوی و حتی کشور دارا می‌باشند؛ و رقم خاتونی، رقم مناسب برای تولید بذر است. بنظر می‌رسد تهیه‌ی برگه از این ارقام، باعث افزایش ارزش افزوده شود و مقرون به صرفه اقتصادی باشد. بنابراین پژوهش حاضر با اهداف تعیین رقم خربزه و پیش تیمار اسمزی مناسب برای خشک‌کردن میوه؛ و تعیین نوع بسته‌بندی و دمای مناسب جهت نگهداری برگه‌ی خربزه انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد و ابزار

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل: میوهء خربزه (ارقام خاتونی و تاشکندی (درگزی)) و شکر بوده است. مواد بسته‌بندی (پلی‌اتیلن با دانسیته پایین، پلی‌استایرن و پلی‌آمید- پلی‌اتیلن (ضخامت ۸۵ میکرون)) از شرکت زرین آسیا و مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک با درجه خلوص ۹۹/۵ درصد تهیه شدند.

دستگاه‌های مورد استفاده شامل: ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم، ترازوی معمولی با دقت ۰/۱ گرم، کولیس، خشک‌کن کابینتی،

1Pecan(Carya illinoinensis)

پمپ خلاء، قیف بوخنر، دستگاه بسته بندی هنکلمن[1] مدل A200Gerhardt، pH متر مدل Metrohm، رفراکتومتر رومیزی مدل WAG 2، دستگاه بافت سنج[2] مدل(CNS Farnell,Hertfordshire,UK)، گازآنالایزر[3] قابل حملمدل OXYBABY VO_2/CO، دستگاه اندازه‌گیری فعالیت آبی(a.w)[4] مدل(Novasina AG 8853, ms1 a.w)، اسکنر[5] مدل HP Scajet G3010 بوده اند.

روش اجرای طرح

از دو رقم خربزه تاشکندی و خاتونی جهت تولید برگه خربزه استفاده شد. به این منظور ابتدامیوه‌ها کاملا تمیز و شسته شده سپس عملیات پوست‌گیری و جداسازی قسمت‌های زائد بر روی آنها انجام گردید. آنگاه گوشت خربزه به صورت مکعب به ابعاد ۲ سانتی‌متر برش زده شده و در محلول اسمزی (۱۰ درصد ساکارز) به مدت ۳ ساعت در دمای محیط غوطه‌ور شدند. از یک صافی پلاستیکی برای غوطه‌ور کردن قطعات خربزه در داخل ظرف‌های پلاستیکی حاوی محلول‌های اسمزی استفاده شد. پس از اتمام زمان تعیین شده برای هر تیمار، نمونه‌ها از محلول‌ها خارج شده و به مدت ۱۵ دقیقه روی صافی برای حذف آب اضافی پخش شدند و همراه با نمونه‌های شاهد (بدون تیماراسمزی) بطور جداگانه بر روی طبق‌های مشبک چیده باخشک-کن کابینتی(دمای۵۰ درجه سانتی‌گراد ، سرعت دمنده کم) خشک شدند. برگه‌های تولیدی با دو روش بسته‌بندی تحت اتمسفر تغییر یافته(بافیلم بسته بندی دولایه PE-PA با ضخامت ۸۵ میکرون دارای دو ترکیب گازی) و بدون تغییر در اتمسفر (با دو فیلم بسته‌بندی پلی-اتیلن و پلی‌استایرن) بسته‌بندی شدند.

تغییر اتمسفر با استفاده از دستگاه بسته‌بندی هنکلمن (مدل A200 Gerhardt) مجهز به سیستم تزریق گاز انجام شد. ۲ ترکیب گاز مورد استفاده عبارت از ۷۰ درصد دی‌اکسیدکربن، ۳۰ درصد نیتروژن (ترکیب گاز ۱) و ۶۰ درصد دی‌اکسیدکربن، ۴۰ درصد نیتروژن (ترکیب گاز ۲) بودند. سپس بسته‌ها در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ماه نگهداری شدند. در پایان این مدت، پارامترهای غلظت گازهای اکسیژن و دی‌اکسیدکربن در بسته،فعالیت آب، جذب مجدد آب، ماکزیمم نیرو، رطوبت و مولفه‌های رنگ در برگه‌ی خربزه اندازه‌گیری شدند.

1Henkelman
2Texture Analyzer
3Gas Analyzer
4Water activity meter
5Scanner

روش‌های آزمون

رطوبت: مقدار حدود ۱۰ گرم از نمونه همگن شده تا رسیدن به وزن ثابت در آون خشک شده و پس از خنک شدن در دسیکاتور و توزین، درصد رطوبت از رابطه زیر محاسبه شد:

(۱) وزن اولیه /(۱۰۰× (وزن بعداز خشک شدن− وزن قبل از خشک شدن)

جذب مجدد آب: برای سنجش میزان جذب مجدد آب توسط نمونه‌های خشک شده برگه‌ی خربزه، حدود ۱۰ گرم نمونه توزین شده و در ارلن محتوی ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه از آب خارج شده و بر روی کاغذ صافی وزن شده بر روی قیف بوخنر قرار گرفت و توسط پمپ خلاء متصل به دستگاه به مدت ۱ دقیقه آب اضافی آن گرفته شد.سپس کاغذ صافی و نمونه توزین شد و ظرفیت جذب مجدد آب نمونه از رابطه زیر بدست آمد (Funebo *et al*, 2000؛ Lewiki, 1998):

ظرفیت جذب مجدد آب $=(w_t/w_d)\times 100$ (۲)

w_t = وزن نمونه مرطوب، w_d= وزن نمونه خشک

آزمون بافت: برای ارزیابی ویژگی‌های بافتی برگه‌ی خربزه پس از آبگیری مجدد، از دستگاه بافت سنج (texture analyzer, CNS Farnell,Hertfordshire,UK) استفاده شد. بدین طریق نیروی لازم برای نفوذ یک پروب مخروطی با قطر ۲/۵ میلی‌متر با سرعت ۱ میلی‌متر در ثانیه به داخل بافت محاسبه گردید. پارامتر اندازه‌گیری شده عبارت از حداکثر نیرو بر حسب گرم بود که معادل سفتی بافت در نظر گرفته می شود (Funebo *et al*, 2000؛Lewiki, 1998)

رنگ: با استفاده از تکنیک پردازش تصویر انجام شد. به منظور استفاده از این تکنیک از اسکنر (HP Scajet G3010) استفاده شد بمنظور جلوگیری از ورود هرگونه نور جانبی، سطح اسکنر با پارچه کاملا سیاه و ضخیم پوشانیده شد. تصاویر با وضوح ۶۰۰ dpi و فرمت JPEG ذخیره گردیدند. پس از انتقال تصاویر به رایانه، مختصات رنگی آنها در فضای رنگی L* a* b* با نرم افزار Image j (version 1.40g) استخراج شد (Singh*et al*, 2006).

فعالیت آب: تعیین فعالیت آبی با استفاده از دستگاه واتراکتیویته متر (Novasina AG 8853, ms1 a.w)و مطابق روش شرکت سازنده، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام و گزارش شد (Aqualab).

اندازه‌گیری غلظت گاز های موجود در بسته: غلظت گاز درون

بسته بـا اسـتفاده از دسـتگاه آنـالایزر پرتابلمـدل OXYBABY V O_2/CO ارزیابی شد. برای این کار سـرنگ دسـتگاه را درون فضـای بسته فرو کرده و سپس دستگاه ۵ میلی‌لیتر از گاز داخـل بسـته را بـه داخل سیستم مکش می‌کنـد آنگـاه بصـورت اتوماتیـک غلظـت گـاز اکسیژن و دی‌اکسیدکربن داخل بسته را گزارش می‌کند(Ullsten & Antmann*et al*,2008؛Hedenquvist, 2003).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمونها در سه تکرار انجـام و نتـایج بـا اسـتفاده از آزمـایش فاکتوریل ۴ عاملی در قالـب طـرح کـاملا تصـادفی تجزیـه و تحلیـل شد.برای مقایسه میانگین‌ها از نرم افزار آمـاری MstatC بـر اسـاس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح ۵ درصد)استفاده شد. نمودارهای مربوطه با نرم‌افزار Excell ترسیم شدند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های کمی و کیفی

جذب مجدد آب

برگه‌ی خربزه که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بـود نسبت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد دارای میـزان جـذب مجـدد آب بیشـتر بود(جدول۱). رقم تاشکندی دارای میزان جـذب مجـدد آب بیشـتر از رقم خاتونی بود (جدول۱). برگه‌ی خربزه کـه بـا محلـول اسـمزی ۱۰ درصد پیش تیمار شده بود دارای میزان جذب مجدد آب بیشتر از برگه شـاهد بـود (جـدول۱). میـزان جـذب مجـدد آب در برگـه‌ی خربـزه بسته‌بنـدی شـده در اتمسـفر ۱ و اتمسـفر ۲ مشـابه و از بسـته‌بنـدی پلی‌اتیلن و پلی‌استایرن بیشتر بود (جدول۱).

برگه‌ی پیش تیمار شده با محلول ۱۰درصداسـمزی، بسـته‌بنـدی شده در اتمسفر ۲ و نگهـداری شـده در ۴ درجـه سـانتی‌گـراد، دارای حداکثر میزان جذب آب بود (جدول۲).

ماکزیمم نیروی وارده بر بافت

برگه‌ی خربزه که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گـراد نگهـداری شـده بود نسبت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراددارای ماکزیمم نیرو بیشتر بـود (جدول۱). رقـم تاشـکندی دارای مـاکزیمم نیـروی بیشـتری از رقـم خاتونی بود (جدول۱). برگه‌ی خربزه که با محلول شـاهد پـیش تیمـار شده بـود دارای مـاکزیمم نیـروی بیشـتری بـود (جـدول۱). برگـه‌ی بسته‌بندی شده با پلی اتـیلن دارای مـاکزیمم نیـروی بیشـتری بـود (جدول۱).

همچنین برگه‌ی پیش تیمار شده بـا محلـول ۱۰درصـد اسـمزی، بسته‌بندی شده در اتمسفر ۲ و نگهداری شده در ۴ درجه سـانتی‌گـراد همـراه بـا تیمـار ۱۰درصـد، پلـی‌اسـتایرن، ۴ درجـه سـانتی‌گـراد و تیمار۱۰درصد، اتمسفر ۱ ، ۲۵ درجه سانتی‌گراد دارای حـداقل میـزان نیروی وارده بر بافت بودند (جدول۲).

ساختار میوه خشـک تحـت تـاثیر دو عامـل جـذب مجـدد آب و مـاکزیمم نیـروی وارده بـر بافـت اسـت (Funebo *et al*, 2000؛ Lewiki, 1998). مطالعات ریزساختار در توت فرنگی(Prinzivalli *et al*, 2006) و آنانـاس (Fernandes *et al*, 2009) خشـک شـده بصورت اسمزی مشخص کرد که در مراحل اولیه تیمار اسـمزی، بـه دلیل کاهش آب میوه تغییراتی در سـلول‌هـا مشـاهده شـد. در همـه قسمت‌های نمونه، دیواره‌های سلولی کوچکتر شد و در بعضی منـاطق فضاهای بین سلولی کاهش یافتند. در این مرحله دیواره سلولی هنـوز محکم است. معمولاپکتین باندشـده غیرقابـل حـل، نقـش مهمـی در پیوستگی سلول‌ها و سفتی بافت دارد که در مراحل اولیه خشک کردن اسمزی بصورت قابل حل در می‌آید. بـا ادامـه تیمـار اسـمزی، بیشـتر فضاهای بین‌سلولی ناپدید شده و دیواره‌های بیشتری آسیب می‌بینـد. تیمار اسمزی به مدت ۲ سـاعت سـبب شکسـته شـدن دیـواره‌هـای سلولی گردیده و سلول‌های باقیمانـده هـم دارای دیـواره‌هـای بسـیار غیرطبیعی می‌شوند و به دلیل حل شدن پکتین، کاهش قدرت دیـواره سلولی رخ می‌دهد. در این مرحله دیواره‌های سلولی ضعیف‌تر شـده و در برابر استرس مقاومت کمی دارند و نسـبت بـه نمونـه تیمـار نشـده دارای سفتی کمتری هستند.

فعالیت آب

برگه‌ی خربزه که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گـراد نگهـداری شـده بود نسبت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دارای میزان فعالیت آب بیشتر بود (جدول۱). رقـم تاشـکندی دارای میـزان فعالیـت آب بیشـتر بـود (جدول۱). برگه‌ی خربزه که با محلول شـاهد پـیش تیمـار شـده بـود دارای میزان فعالیت آب بیشتری بود (جدول۱).

رطوبت

رقم خاتونی دارای رطوبت بیشتر از رقم تاشکندی بود (جـدول۱). برگه‌ی خربزه که با محلول شاهد پیش تیمار شده بود نسبت به پـیش تیمار اسمزی دارای میزان رطوبت بیشتری بود (جدول۱).

مولفه‌های رنگی

برگه نگهداری شده در دمای ۴ درجـه سـانتی‌گـراد دارای میـزان زردی (b*) و روشنی رنگ (L*) بیشتر و در ۲۵ درجه میزان قرمـزی (a*) بیشتر بود. برگه تولید شده از رقم خاتونی دارای میـزان قرمـزی (a*) بیشتری بود. برگه‌ی خربزه تیمار شـده بـا محلـول اسـمزی ۱۰ درصـد دارای زردی (b*) و روشـنی رنـگ (L*) بیشـتری بـود. در پلی‌اتیلن زردی (b*) و روشنی رنگ (L*) کمتر از تیمارهای دیگر بود (جدول۳).

برگه پیش تیمار شده با محلول ۱۰درصدو بسته‌بندی شده با اتمسفر ۲ دارای حداقل میزان قرمزی (*a) بود (شکل۱).

*b میزان زردی به آبی بودن است.کاهش مقیاس زردی به آبی بودن (*b) می‌تواند به دلیل تجزیه پیگمان‌های کلروفیل و کاروتنوئید (Weemaes *et* ؛ Palou *et al*, 1999؛ Lee & Coates, 1999 *al*, 1999، قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی میلارد و تشکیل پیگمان‌های قهوه‌ای باشد (Maskan, 2001; Rhim,*et al*. 1989).

*a میزان قرمزی به سبزی است. افزایش مقیاس قرمزی به سبزی(*a) نشان‌دهنده از دست رفتن سبزی کلروفیل در طی فرآیند خشک شدن است (Palou *et al*, ؛Lee & Coates, 1999) (Weemaes*et al*, 1999؛1999). L میزان روشنی به تاریکی است. کاهش (L) نشان‌دهنده کاهش روشنی است که در میوه خشک شده بعنوان مقیاسی از قهوه‌ای شده در نظر گرفته می‌شود (Coates, Lee&1999).

فرآیند خشک‌کردن سبب قهوه‌ای شدن برگه‌ها یا به عبارتی میزان بالاتر اندیس *a و میزان پایین‌تر اندیس‌های *L و *b می‌گردد. پیش تیمار با محلول اسمزی ساکارز سبب محافظت از رنگ محصول در مدت خشک‌کردن شده و در نتیجه میزان اندیس *a نمونه‌ها کاهش می‌یابد (Cortellino,*etal*. 2011).

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر مستقل دمای نگهداری، رقم، تیمار و بسته‌بندی بر ویژگی‌های کمی و کیفی برگه‌یخربزه پس از شش ماه انبارمانی

		ویژگی‌های کمی و کیفی							
		جذب(درصد)		فعالیت آب		رطوبت(درصد)		ماکزیمم نیرو(گرم)	
دمای نگهداری	۲۵	۱۶۲/۵۶	b	۰/۵۵۵	a	۱۸/۲۸۱	a	۴۶/۹۹۶	a
(درجه سانتی‌گراد)	۴	۱۸۳/۷۰۹	a	۰/۵۴۶	b	۱۷/۹۵۸	a	۳۶/۰۵۸	b
رقم	خاتونی	۱۶۴/۳۳۱	b	۰/۵۴۸	b	۱۸/۶۱۹	a	۳۳/۹۵۴	b
	تاشکندی	۱۸۱/۹۳۸	a	۰/۵۵۳	a	۱۷/۶۱۹	b	۴۹/۱	a
محلول اسمزی	۱۰	۱۷۶/۵۴۲	a	۰/۵۴۸	b	۱۷/۷۸۴	b	۳۰/۸۹۲	b
(درصد)	صفر(شاهد)	۱۶۹/۷۲۶	b	۰/۵۵۳	a	۱۸/۴۵۵	a	۵۲/۱۶۳	a
بسته‌بندی	پلی اتیلن	۱۶۸/۲۰۱	b	۰/۵۶۱	a	۱۸/۱۵۳	a	۴۶/۶۵۸	a
	پلی استایرن	۱۷۰/۲۹۸	b	۰/۵۵۹	a	۱۸/۲۵	a	۳۷/۹۷۵	b
	اتمسفر ۱	۱۷۵/۸۳	a	۰/۵۳۲	c	۱۸/۱۹۴	a	۳۹/۲۹۲	b
	اتمسفر ۲	۱۷۸/۲۰۸	a	۰/۵۵۱	b	۱۷/۸۸۱	a	۴۲/۱۸۳	a b

در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی می باشند طبق آزمون دانکن با احتمال خطای ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل دمای نگهداری، محلول اسمزی و بسته‌بندی بر ویژگی‌های کمی و کیفی برگه‌ی خربزه پس از ٦ ماه انبارمانی

		دمای نگهداری(درجه سانتی‌گراد)							
		۲۵				٤			
		محلول اسمزی(درصد)							
		۱۰		صفر(شاهد)		۱۰		صفر(شاهد)	
		میزان جذب (درصد)							
بسته‌بندی	پلی اتیلن	۱۵۴/۳۳	h	۱۵۵/۰۲۶	gh	۱۸۱/۱۲	cd	۱۸۲/۳۲۹	cd
	پلی استایرن	۱۶۱/۳۱۱	f	۱۶۰/۰۲۵	fg	۱۶۷/۴۸۹	e	۱۶۴/۰۷۲	ef
	اتمسفر ۱	۱۸۰/۳۹۲	d	۱۵۵/۷۵۴	gh	۱۸۶/۲۹۷	c	۱۸۰/۸۷۷	d
	اتمسفر ۲	۱۸۵/۶۱۳	cd	۱۴۸/۰۲۶	I	۲۱۱/۷۰۳	a	۱۹۵/۷۸۵	b
		ماکزیمم نیروی بافت(گرم)							
بسته‌بندی	پلی اتیلن	۳۳/۷۶۷	efg	۷۳	a	۴۲/۷	cdef	۳۷/۱۶۷	defg
	پلی استایرن	۲۶/۱۳۳	fg	۵۶/۷۶۷	abc	۲۲/۶۶۷	g	۴۶/۳۳۳	cde
	اتمسفر ۱	۲۳/۲۳۳	g	۶۹/۸	ab	۳۹/۶۳۳	cdefg	۲۴/۵	fg
	اتمسفر ۲	۳۶/۶۶۷	defg	۵۶/۶	abc	۲۲/۳۳۳	g	۵۳/۱۳۳	bcd

در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی می باشند طبق آزمون دانکن با احتمال خطای ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

تغییر غلظت گازها در داخل بسته‌ها

با بررسی نتایج مشخص می‌گردد که بسته حاوی برگه‌ی خربزه که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد دارای میزان دی‌اکسیدکربن بیشتر و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد میزان اکسیژن بیشتر بود. بسته دارای برگه‌ی خربزه رقم تاشکندی دارای میزان دی‌اکسیدکربن و بسته حاوی رقم خاتونی دارای میزان اکسیژن بیشتری بود. در بسته حاوی برگه‌ی خربزه که با محلول اسمزی ۱۰درصد پیش تیمار شده بود، میزان دی‌اکسید کربن بیشتر از بسته حاوی برگه‌ی شاهد بود. میزان اکسیژن در بسته که با اتمسفر ۲ بسته‌بندی شده بود در کمترین میزان خود و در همین نوع از بسته‌بندی میزان دی‌اکسیدکربن در حداکثر خود بود (جدول۴).

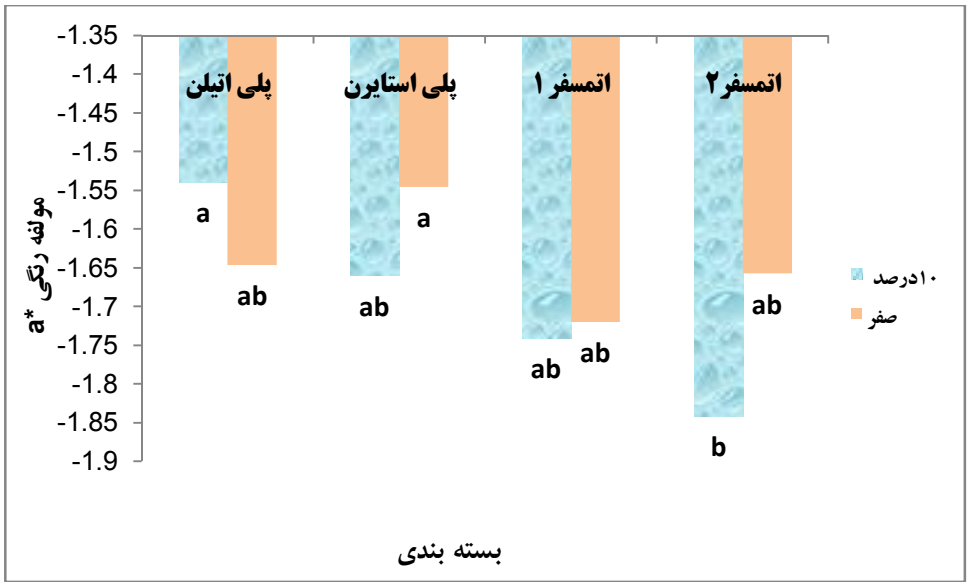
بطورکلی برگه‌ی پیش تیمار شده با محلول ۱۰درصد اسمزی، بسته‌بندی شده در اتمسفر ۲ و نگهداری شده در ۴ درجه سلسیوس دارای حداقل میزان اکسیژن در بسته و حداکثر میزان دی اکسید کربن در بسته بود (جدول۵).

ترکیب هوای فضای خالی بسته در طول نگهداری و پایان زمان ماندگاری محصول با نفوذپذیری مواد بسته‌بندی تعیین خواهد شد. برای بسته‌بندی محصولات تازه در شرایط با اتمسفر تغییر یافته امکان دارد که از فیلم‌های با نفوذپذیری زیاد، متوسط و کم استفاده شود (تاج الدین،۱۳۸۰؛ میرنظامی،۱۳۸۱).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرمستقل دمای نگهداری، رقم، تیمار و بسته‌بندی بر مولفه‌های رنگی در برگه‌ی خربزه پس از شش ماه انبارمانی

		رنگ					
		b^*		a^*		L^*	
دمای نگهداری (درجه سانتی‌گراد)	۲۵	b	-۰/۸۲۹	a	-۱/۴۳	b	۷۸/۱۰۸
	۴	a	-۰/۲۴۲	b	-۱/۹۰۸	a	۸۰/۸۶۲
رقم	خاتونی	a	-۰/۶۴۲	b	-۱/۹۴۲	a	۷۹/۰۴۶
	تاشکندی	a	-۰/۴۲۹	a	-۱/۳۹۶	a	۷۹/۹۲۴
محلول اسمزی(درصد)	۱۰	b	-۰/۹۲۸	a	-۱/۶۹۶	a	۸۰/۷۱۸
	صفر(شاهد)	a	-۰/۱۴۳	a	-۱/۶۴۲	b	۷۸/۲۵۲
بسته‌بندی	پلی اتیلن	b	-۱/۰۸۸	a	-۱/۵۹۲	b	۷۷/۸۳
	پلی استایرن	a	-۰/۴۰۹	a	-۱/۶۹۳	a	۷۹/۳
	اتمسفر ۱	a	-۰/۱۶۸	a	-۱/۷۳۱	a	۸۰/۵۷۱
	اتمسفر ۲	a	-۰/۴۷۸	a	-۱/۶۵۹	a	۸۰/۲۳۸

در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی می باشند طبق آزمون دانکن با احتمال خطای ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.



شکل۱- تاثیر اسمز و بسته بندی بر مولفه‌یرنگی a* در برگه‌ی خربزه پس از ٦ ماه انبارمانی

بسته‌های پلی اتیلن- پلی آمیدی دی‌اکسیدکربن بیشتری را در خود نگه می‌دارند و بسته‌های پلی اتیلن با دانسیته پایین به دلیل نفوذپذیری زیاد مقدار دی اکسیدکربن بیشتری را از خود عبور می‌دهند (تاج الدین،۱۳۸۰ ؛ میرنظامی،۱۳۸۱).

در بسته‌بندی با اتمسفر تغییریافته ترکیب گازهای موجود در بسته ی با نفوذپذیری معلوم، تغییر می‌یابد تا میزان تنفس و رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها کاهش یافته، فساد آنزیمی به تاخیر افتد و در نهایت زمان ماندگاری محصول قرار گرفته در بسته افزایش یابد (Hirsch, 1991&Fellows, 1990).

HalouatEl و Debevereb (۲۰۰۷) کپک‌های ایزوله شده از آلو خشک و کشمش در مراکش را *Aspergillus niger*، *Eurotium amstelodami*، *Penicillium chrysogenum*، *Fusurium oxysporum* برشمردند و این کپک‌ها را در محیط کشت در معرض دو اتمسفر تغییر یافته (۸۰٪ :CO_2-۲۰٪ :N_2; ۶۰ ٪ :CO_2-۴۰٪ :N2) و در دامنه‌ای از فعالیت آبی (۰/۸۰– ۰/۹۵=aw) قرار دادند و نتیجه‌گیری کردند که در شرایط بی‌هوازی و در فعالیت آبی کم از جوانه زدن و رشد همه کپک‌ها جلوگیری شد اما در فعالیت آبی بالا به دلیل وجود مقداری اکسیژن، کنیدی‌ها جوانه زده اما قادر به رشد نبودند. دو اتمسفر تغییر یافته اعمال شده مانع از جوانه زدن *Fusurium oxysporum* و *amstelodamiEurotium* در هر فعالیت آبی گردید. اما در شرایط هوازی در حضور ۵٪ اکسیژن، این دو اتمسفر در مقایسه با شاهد (هوا) سبب تاخیر در جوانه‌زدن همه این کپکها شدند. همچنین در پژوهش El Halouat و همکاران(۲۰۰۸)، دو اتمسفر (۴۰٪ یا ۸۰٪ CO_2) مانع از رشد *Aspergillus niger* شد.

همچنین اوراکیل و استیلس(۱۹۹۰) جهت نگهداری طولانی مدت خشکبار از بسته‌بندی با اتمسفر تغییر یافته استفاده و بیان نمودند که مکانیسم جذب دی اکسیدکربن توسط فرآورده خشک سبب کاهش میزان دی اکسیدکربن و ایجاد خلاء در بسته‌بندی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

بطورکلی نتایج نشان داد که برگه‌ی خربزه پیش تیمار شده با محلول ۱۰درصداسمزی، بسته‌بندی شده در اتمسفر ۲ و نگهداری شده در ۴ درجه سانتی‌گراد، دارای حداکثر میزان جذب آب بود. ماکزیمم نیروی وارده بر بافت در نمونه تیمار شاهد نگهداری شده در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و درنمونه تیمار اسمزی ۱۰درصد نگهداری شده در ۴ درجه سانتیگراد، به ترتیب حداکثر و حداقل بودند. برگه‌ی پیش تیمار شده با محلول اسمزی ۱۰درصد و بسته‌بندی شده در اتمسفر ۱ دارای حداقل میزان فعالیت آب بود. برگه‌ی نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دارایمیزان روشنی (L*) و زردی(b*) بیشتر بود و برگه‌ی نگهداری شده در ۲۵ درجه سانتی‌گراد میزان قرمزی(a*) بیشتری داشت. برگه‌ی تولید شده از رقم خاتونی دارای میزان قرمزی(a*) بیشتر بودبرگه‌یپیش تیمار شده با محلول ۱۰ درصد و بسته‌بندی شده با اتمسفر ۲ دارای حداقل میزان قرمزی(a*) بود.

جدول٤- مقایسه میانگین اثر مستقل دمای نگهداری، رقم، تیمار و بسته‌بندی بر غلظت گازهای بسته حاوی برگه‌ی خربزه پس از شش ماه انبارمانی

		غلظت گازها			
		اکسیژن(درصد)		دی اکسید کربن (درصد)	
دمای نگهداری (درجه سانتی‌گراد)	۲۵	a	۹/۸۱۷	b	۲۲/۵۹۲
	۴	b	۹/۳۶	a	۲۷/۴۴۸
رقم	خاتونی	a	۹/۶۹۸	b	۲۳/۷۲۹
	تاشکندی	b	۹/۴۷۹	a	۲۶/۳۱
محلول اسمزی (درصد)	۱۰	a	۹/۴۹۸	a	۲۶/۳۹۸
	صفر(شاهد)	a	۹/۶۷۹	b	۲۳/۶۴۲
بسته‌بندی	پلی اتیلن	a	۱۵/۹۹۲	c	۱/۴۶۷
	پلی استایرن	a	۱۶/۰۵۴	c	۱/۷۵۴
	اتمسفر ۱	b	۳/۴۰۴	b	۴۵/۳۱۷
	اتمسفر ۲	c	۲/۹۰۴	a	۵۱/۵۴۲

در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی می‌باشند طبق آزمون دانکن با احتمال خطای ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل دمای نگهداری، محلول اسمزی و بسته بندیبر غلظت گازهای بسته حاوی برگه‌ی خربزه پس از ٦ ماه انبارمانی

		دمای نگهداری(درجه سانتیگراد)							
		٤				۲۵			
		محلول اسمزی(درصد)							
		صفر(شاهد)		۱۰		صفر(شاهد)		۱۰	
		میزان اکسیژن(درصد)							
بسته بندی	پلی اتیلن	۱۵/۹۱۷	ab	۱۵/۹۶۷	ab	۱۶/۰۶۷	ab	۱۶/۰۱۷	
	پلی استایرن	۱۶/۱۶۷	ab	۱۵/۵۱۷	b	۱۵/۹۶۷	ab	۱۶/۵۶۷	a
	اتمسفر ۱	۳/۱۱۷	de	۴/۷۶۷	c	۲/۸۶۷	ef	۲/۸۶۷	ef
	اتمسفر ۲	۳/۴۶۷	de	۳/۶۱۷	d	۲/۱۱۷	g	۲/۴۱۷	fg
		میزان دی اکسید کربن(درصد)							
بسته بندی	پلی اتیلن	۱/۵۶۷	h	۱/۴۶۷	h	۱/۴۱۷	h	۱/۴۱۷	h
	پلی استایرن	۱/۹۶۷	h	۱/۸۶۷	h	۱/۵۱۷	h	۱/۶۶۷	h
	اتمسفر ۱	۴۲/۶۶۷	e	۴۱/۳۶۷	f	۵۷/۲۱۷	b	۴۰/۰۱۷	g
	اتمسفر ۲	۵۷/۱۶۶	B	۴۴/۱۶۷	d	۵۹/۱۶۷	a	۴۵/۱۶۶	c

در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی می‌باشند طبق آزمون دانکن با احتمال خطای ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

. با بررسی نتایج مشخص گردید که برگه‌ی خربزه نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد دارای میزان دی اکسیدکربن بیشتر و میزان اکسیژن کمتر بود. رقم تاشکندی دارای میزان دی اکسیدکربن و در مقابل رقم خاتونی دارای میزان اکسیژن بیشتری بود. برگه‌ی پیش تیمار شده با محلول ۱۰درصداسمزی، بسته‌بندی شده در اتمسفر ۲ و نگهداری شده در ۴ درجه سانتی‌گراد دارای حداقل میزان اکسیژن در بسته و حداکثر میزان دی اکسیدکربن در بسته بود. لذا با توجه به نتایج مشخص شد که برگه‌ی خربزه رقم تاشکندی پیش تیمار شده با محلول ۱۰درصداسمزی، بسته بندی شده در اتمسفر ۲ و نگهداری شده در ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به سایر تیمارها، در مدت نگهداری خصوصیات کمی و کیفی خود را بیشتر حفظ نموده بود

منابع

تاج الدین،ب.۱۳۸۰. بسته بندی مواد غذایی با اتمسفر تغییر یافته(ترجمه). انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

گنجلو، علی .۱۳۸۴. بررسی عوامل موثر بر فرآوری خربزه و طالبی به روش خشک کردن اسمزی. پایان نامه کارشناسی ارشد. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

گنجلو، ع.، شهیدی، ف.، وریدی، م .و کوچکی، آ. تاثیر یون $Ca2+$ و نوع محلول قندی بر ویژگیهای فیزیکوشیمیایی و حسی طالبی آب گیری شده به روش اسمز. علوم و صنایع کشاورزی سال ۲۰۰۷ ، جلد۳.

میرنظامی ضیابری، ح.۱۳۸۱. اصول بسته بندی مواد غذایی. ناشر آییژ.

صفری، محمد.۱۳۸۴. مبانی فیزیکوشیمیایی نگهداری مواد غذایی. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران.

قنبرزاده، بابک. ۱۳۸۴. مبانی شیمی مواد غذایی. چاپ دوم. انتشارات آییژ.

Ade - Omowaye, B. I. O.,Rastogi, N. K;Angerbach ,A.and Knorr, D. 2002.Osmotic dehydration behavior of Red Paprica(Capsicum Annum L.). *Journal of Food Science* ; 67(5).

Antmann, G., Ares, G., Lema, P, and Lareo, C. 2008. Influence of modified atmosphere packaging on sensory quality of shiitake mushrooms.*Postharvest Biology and Technology*, 49, PP: 164- 170.

Aaron L. Brody. and Kenneth. S. Marsh . 1997. A Wiley Encyclopedia of Packaging Technology.

Available http: // www. Systech.com / The use of headspace Gas Analyzers in the modified atmosphere packaging of dried fruit.

Available http: // www. Aqualab.com/ Education/ Intro to water activity / Nuts and dried fruits.

Cortellino,G., Pani, P .and Torreggiani,D. 2011.Crispy air-dried pineapple rings: optimization of processing parameters.

Procedia Food Science.1 : 1324 – 1330.
Doymaz, I. 2004. Effect of pre-treatments using Potassium Metabisulphite and Alkaline Ethyl Oleate on the Drying Kinetics of Apricots. *Journal of Postharvest technology*, 89: 281-287.
El Halouat,A.,Gouramab, H., Uyttendaelec, M .and Debevereb, P.J.M. 1998. Effects of modified atmosphere packaging and preservatives on the shelf-life of high moisture prunes and raisins.*International Journal of Food Microbiology* 41: 177–184.
El Halouat,A .and Debevereb, P.J.M. 1997. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. *International Journal of Food Microbiology* 35:41-48.
Fernandes, F.A.N., Gallao,M.I .and Rodrigues ,S. 2009.Effect of osmosis and ultrasound on pineapple cell tissue structure during Dehydration.*Journal of Food Engineering* 90: 186–190.
Fellows, P. J. 1990. Controlled and modified atmosphere storage. In: Food Processing Technology.PP. 371-396. Ellis Horwood London.
Funebo, T., Ahrne, I., Kidman, S., Langton, M ,and Skjolderbrand, C. 2000. Microwave heat treatment of aoole before air dehydration-effects of physical properties and microstructure.*Journal of food engineering*.46: 173-182.
Hirsch, A. 1991.Flexible food packaging. R Van Nostrand Reinhold: 5- 9, 14- 20, 56- 65.
Lewiki, P. P. 1998a.Some remarks on rehydration of dried food.*Journal of food engineering*. 36:81-87.
Lewiki, P. P. 1998b. Effect of pre-drying treatment, drying and rehydration on plant tissue properties: a review. *International Journal of food properties* 1(1): 1-22.
Lee, H.S. and G.A. Coates, 1999. Thermal pasteurization effects on color of red grapefruit juices. *Journal of Food Science*, 64: 663-666.
Maskan, M., 2001.Kinetics of color change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering*, 48: 169-175.
Ooraikul, B ,and Stiles, M. E.1990. Modified Atmosphere Packaging of Food.Ellis Horwood series in food science and technology. pp: 255- 256.
Paine, A. F. and Paine, Y. H. 1992.Modified atmosphere packaging. Hand book of Food Packaging, Chapman and hall, 242-246.
Palou, E., A. Lopez-Malo, G.V. Barbosa-Canovas, J. Welti-Chanes and B. G. Swanson, 1999. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree, *Journal of Food Science*. 64: 42-45.
Prinzivalli, C., Brambilla, A., Maffi, D., Scalzo, R. L., & Torreggiani, D.2006.Effect of osmosis time on structure, texture and pecticcomposition of strawberry tissue. *European Food Research andTechnology*, 224, 119–127.
Rahman, M. S . and Perera, C. O. 1999. Drying and food preservation. In Handbook of food preservation. Marcel *Dekker New York.* PP. 173- 216.
Rahman, M. S. 2007. Handbook of food preservation 2nd ed. CRC press.P. 408, 409, 420.
Rhim, J.W., R.V. Nunes, V. A. Jones and K. R. Swartzel, 1989. Kinetics of color change of grape juice generated using linearly increasing temperature, *Journal of Food Science*. 54: 776-777.
Singh, B., Panesar, S., Gupta, A. K. and Kennedy, F., 2006, Optimization of osmotic dehydration of carrot cubes in sucrose-salt solutions using response methodology. *European Food Research and Technology*, 225, 157-165.
Souci, S.W; Fachmann, W. and Kraut, H. 2000.Food composition and nutrition tables.Scientific Publishers Stuttgart.
Ullsten, N. H. and Hedenquvist, M. S, 2003, A new test method based on on head space analysis to determine permeability to oxygen and carbon dioxide of flexible packaging. *Polymer Testing*, 22, PP: 291-295.
Weemaes, C.V. Ooms, L. Indrawati, I. Ludikhuyze, V. Broeck, A. Loey and M. Hendrickx. 1999. Pressure-temperature degradation of green color in broccoli juice. *Journal of Food Science*, 64(3): 504-508

جدول ضمیمه ۱ - میانگین مربعات اثر دمای نگهداری، رقم، تیمار و بسته بندی بر ویژگی‌های کمی و کیفی برگه ی خربزه پس از ٦ ماه انبارمانی

	منابع تغییرات			
	جذب(درصد)	فعالیت آب	رطوبت(درصد)	ماکزیمم نیرو(گرم)
دمای نگهداری (A)	۱۰۷۳۵/۱۰۵**	۰/۰۰۲**	ns۲/۴۹۲	۲۸۷۱/۰۹۴**
رقم (B)	۷۴۴۰/۵۷۸**	۰/۰۰۱*	۲۴/۰**	۵۵۰۵/۵۱**
A×B	ns۳/۲۶۱	۰/۰۰۱**	ns۰/۰۰۰۱	۳۹۱/۲۳۴*
محلول اسمزی (C)	۱۱۱۴/۸۶۶**	۰/۰۰۱*	۱۰/۷۹**	۱۰۸۵۸/۷۶۱**
A×C	۱۸۹۵/۹۱۷**	۰/۰۰۱*	ns۰/۸۵۱	۳۹۴۴/۹۷**
B×C	ns۱۷/۳۲۵	۰/۰۰۲**	ns۰/۰۰۰۱	۶۳۷/۵۷**
A×B×C	*۱۲۲/۳۹۳	۰/۰۰۴**	ns۰/۰۰۰۱	۴۹۴/۱۳۴*
بسته بندی (D)	۵۲۳/۰۵۹**	۰/۰۰۴**	ns۰/۶۴۴	۳۵۴/۹۹۸**
A×D	۱۴۵/۴۹۸**	**۰/۰۰۱	ns۱/۲۴۹	ns۷۷/۴۰۴
B×D	۱۳۹۴/۰۲۳**	**۰/۰۰۴	ns۰/۰۰۰۱	۳۵۰/۲۱۴**
A×B×D	۵۰۲/۸۷۹**	**۰/۰۰۱	ns۰/۰۰۰۱	ns۲۱۲/۶۷۵
C×D	۶۴۸/۳۲۳**	۰/۰۰۲**	ns۱/۶۹۵	ns۲۰۳/۴۶۶
A×C×D	۳۳۶۱/۴۵۸**	ns۰/۰۰۰۱	ns۱/۶۴۹	۱۶۷۳/۷۹۲**
B×C×D	۳۴۲/۱۵۴**	۰/۰۰۱*	ns۰/۰۰۰۱	۴۵۸/۱۹۸**
A×B×C×D	۱۱۱۱/۴۰۵**	۰/۰۰۱*	ns-۰/۰۰۰۱	۱۰۱۵/۲۹۵**
خطا(*)	۱۷/۶۴۶	۰/۰۰۰۱	۰/۸۹۶	۸۲/۷۴۷

بدون اختلاف معنی دارns اختلاف معنی دار در سطح ۵٪* اختلاف معنی دار در سطح ۱٪**

جدول ضمیمه۲- میانگین مربعات دمای نگهداری، رقم، تیمار و بسته‌بندی بر مولفه‌های رنگی در برگه ی خربزه پس از ٦ ماه انبارمانی

	میانگین مربعات		
منابع تغییرات	b*	a*	L*
دمای نگهداری (A)	۸/۲۵۳**	۵/۴۷۷**	۱۸۲/۰۷۲**
رقم (B)	ns۱/۰۷۹	۷/۱۵۶**	ns۱۸/۵۲۹
A×B	ns۰/۵۰۷	۰/۳۵۴*	ns۴/۷۴۵
محلول اسمزی (C)	۱۴/۷۶۷**	ns۰/۰۶۹	۱۴۵/۹۰۳**
A×C	۱۳/۰۹۴**	ns۰/۰۱۵	ns۲۲/۶۰۳
B×C	ns۰/۵۵۱	۰/۲۷*	۲۶/۵۷۶*
A×B×C	ns۳/۰۷۵	ns۰/۰۱۶	ns۳/۸۴۴
بسته بندی (D)	۳/۶۷۶**	ns۰/۰۸۳	۳۶/۱۷**
A×D	ns۰/۹۱۱	ns۰/۰۱۷	ns۹/۰۸۷
B×D	۲/۹۴۳*	ns۰/۱۰۲	۱۸/۵۷۲*
A×B×D	۴/۰۴۵**	ns۰/۰۴	ns۸/۲۶۹
C×D	ns۰/۶۸۱	۰/۱۷۷*	ns۱۱/۸۰۶
A×C×D	ns۱/۹۹۳	ns۰/۰۶۰	ns۱۰/۰۰۹
B×C×D	ns۰/۵۱۷	ns۰/۱۵	ns۱۰/۶۶۴
A×B×C×D	۳/۱۱۶*	۰/۱۵۹*	ns۱۲/۱۸۱
خطا(*)	۰/۸۴۶	۰/۰۵۷	۵/۸۰۴

بدون اختلاف معنی دارns اختلاف معنی دار در سطح ۵٪* اختلاف معنی دار در سطح ۱٪**

جدول ضمیمه۳- میانگین مربعات دمای نگهداری، رقم، تیمار و بسته بندی بر غلظت گازهای بسته حاوی برگه ی خربزه پس از ٦ ماه انبارمانی

	اکسیژن(درصد)	دی اکسید کربن(درصد)
دمای نگهداری (A)	۴/۹۹۶**	۵۶۵/۹۹۶**
رقم (B)	۱/۱۴۸*	۱۵۹/۹۰۸**
A×B	۵/۵۵۸**	۵۸/۱۲۶**
محلول اسمزی (C)	ns۰/۷۸۸	۱۸۲/۳۲۶**
A×C	ns۰/۳۳۸	۹۶/۶۰۱**
B×C	۱۱/۵۵۱**	۶۶/۸۳۳**
A×B×C	**۳/۰۴۶	۱۳۱/۸۳۶**
بسته بندی (D)	۱۳۲۵/۸۵۳**	۱۷۶۹۱/۲۹۶**
A×D	۴/۲۷۸**	۲۴۹/۸۱۱**
B×D	۱/۴۲۱**	۱۲۸/۳۵۸**
A×B×D	ns۰/۵۳۶	۱۴۰/۵۸۶**
C×D	۱/۱۱۱*	۱۱۶/۴۸۱**
A×C×D	۲/۱۳۶**	۹۴/۳۶۶**
B×C×D	۱/۴۲۸**	۱۰۴/۶۷۳**
A×B×C×D	۰/۹۰۸*	۱۰۳/۷۰۶**
خطا(*)	۰/۲۷۱	۰/۲۷۱

بدون اختلاف معنی دارns اختلاف معنی دار در سطح ۵٪* اختلاف معنی دار در سطح ۱٪**

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 403-414

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۱۴-۴۰۳

.Effect of cultivar, osmosis, packaging and storage temperature on quantitative and qualitative characteristics of dried melon

Sh. Nikkhah[1]- N. Sedaghat[2*]

Received: 2014.04.15
Accepted: 2014.07.06

Introduction: This research was carried out in order to investigate the effects of packaging type and storage temperature on qualitative and quantitative characteristics of dried melon.

Materials and methods: “Thashkandi” and ‘ Khatoni” melon varieties؛ osmotic solutions (0% (control) and 10% sucrose) and cabinet dryer (50°c with low air velocity)were employedfor dried melon production. Dried fruits were packed with modified atmosphere (polyamid-polyethylene fim, 85 micron thickness, and two gas mixtures) and without modified atmosphere (polyethylene and polystyrene films). 100 grams of dried melon were used for each package. For modifying atmosphere, 2 gas mixtures (70% CO_2%, 30% N2 and 60% CO_2%, 40% N2) were applied.

Discussion & Results:Generally, theresults showed that control samplein 10% osmotic solution keptin 25°Cand4°Chad the most and the least firmness, respectively. Melon pretreated by 10% osmotic solution, packed in atmosphere 1 had the least water activity. Dried melon preserved in 4°Cshowedthe highestL*(brightness) and b*(yellowness) valueswhile the highest a*(redness) value was observed at 25°C. Khatooni cultivar produced dried melon with higher a*(redness). Dried melon pretreated by 10% osmotic solution and packed in atmosphere 2 showedthe leasta*(redness). Dried melon preserved at4 °Cshowed highest CO2% and at25°C showed thehighestO2% in package. Tashkandi and Kkatooni had higher CO2% and O2% respectively. Furthermore dried melon pretreated by 10% osmotic solution and packed in atmosphere 2 and preserved in 4°C for 6 months had minimum O2% and maximum CO2% in package.

Finally,the results showed that dried melon” tashkandi” pretreated by 10% osmotic solution and packed in atmosphere 2 and preserved in 4°C for 6 months maintained its qualitative and quantitative characteristics better than the other treatments.

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

1- Scientific staff in Khorasan Agricultural and Natural Resources Researh Center
2- Associate Professor, Dept. Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi Universityof Mashhad.
(*-Corresponding Author Email: sedaghat@yahoo.com)

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 415-427

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۲۷-۴۱۵

بررسی اثر پوشش خوراکی ژلاتین-کربوکسی متیل سلولز بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی پسته برشته شده طی زمان ماندگاری

ناصر صداقت[۱]، سارا خشنودی‌نیا[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۲۴

چکیده

پسته سرشار از اسیدهای‌چرب غیراشباع است که همین امر بعد از برشته شدن آن را به اکسیداسیون حساس‌تر می‌نماید. در ایران علی‌رغم وجود پسته‌ی خام مرغوب و صنعت فرآوری پسته، صادرات پسته برشته بسته‌بندی به دلیل ماندگاری کم و تغییرات شدید طعم چندان متداول نمی‌باشد، این تحقیق به بررسی تأثیر ژلاتین در ترکیب با کربوکسی‌متیل‌سلولز به‌عنوان پوشش خوراکی در به تأخیر انداختن اکسایش پسته‌ی برشته می‌پردازد. پوشش خوراکی ژلاتین (۴٪ وزنی/ حجمی) و کربوکسی‌متیل‌سلولز (۱٪ وزنی/ حجمی) در کنار آنتی‌اکسیدان اسیدآسکوربیک (۱٪ وزنی/ حجمی) دراین پژوهش بر روی پسته‌های برشته شده تیمار شد. آزمایشات شامل اندازه‌گیری اسیدچرب‌آزاد (٪)، پراکسید ($meq.O_2.kg^{-1}$)، رطوبت (٪)، سختی (نیوتن) و ارزیابی حسی (بافت، طعم، رنگ، تندی و پذیرش کلی) در طول سه ماه نگهداری در دمای ۳۵°C و ۵۰ انجام گرفت. نتایج نشان داد اکسیداسیون در تمام نمونه‌های پوشش‌دار به‌طور معنی‌داری کم‌تر از نمونه‌ی شاهد است ($P<۰/۰۵$). این نتایج توسط آنالیزهای حسی نیز تأیید شد. بهترین عملکرد در پوشش مرکب ژلاتین- کربوکسی‌متیل‌سلولز دیده شد. نتایج آنالیز بافت نشان داد، تمام پسته‌های پوشش‌دار به‌ویژه پوشش کربوکسی‌متیل‌سلولز سختی و رطوبت بیش‌تری نسبت به نمونه‌ی شاهد داشتند. اسیدآسکوربیک به تنهایی یا در ماتریکس پوشش خوراکی باعث کاهش معنی‌دار امتیاز رنگ شد. استفاده از پوشش خوراکی ژلاتین -کربوکسی‌متیل‌سلولز حاوی اسیدآسکوربیک می‌تواند پوشش مقرون به صرفه و مناسبی برای کاهش میزان اکسیداسیون و متعاقبا افزایش ماندگاری پسته داشته باشد. ضمن این‌که تأثیر نامطلوبی بر میزان پذیریش کلی محصول نگذارد.

واژه‌های کلیدی: اکسیداسیون، پسته، ژلاتین، کربوکسی‌متیل‌سلولز، زمان ماندگاری.

مقدمه

استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی در یک دهه‌ی اخیر بمنظور افزایش ماندگاری و کیفیت مواد غذایی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. تحقیق و تلاش برای تجاریکردن این پوشش‌ها به دلیل افزایش تقاضا برای تولید محصولاتی با ماندگاری و کیفیت بالا در کنار استفاده‌ی حداقلی از مواد شیمیایی و تولید بسته‌بندی‌های زیست تخریب‌پذیر رو به افزایش است (Mexis*et al*., 2009).

استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی در مواد غذایی مختلف اهداف متفاوتی را دنبال می‌کند. برای نمونه دانه‌های آجیلی به دلیل داشتن درصد بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع در برابر اکسیژن مقاومت چندانی ندارند، لذا در چند سال اخیر استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی بمنظور افزایش زمان ماندگاری و پایداری اکسایشی دانه‌های آجیلی مورد پژوهش بوده است. برای مثال ایزوله‌ی پروتئین آب‌پنیر (Lee &Krochta 2002; Gounga*et al*., 2008; javanmard 2008; mehyar*et al*., 2012) پروتئین سویا (Kang *et al*., 2013)، صمغ کردیا و کربوکسی‌متیل سلولز (Abdul Haq*et al*., 2013)، هیدروکسی‌پروپیل‌متیل‌سلولز (Attares*et al*., 2011; Baldwin, 2006) و کیتوزان (مقصودلو و همکاران، ۱۳۹۲) از جمله پوشش‌های خوراکی بکار رفته بر روی دانه‌های آجیلی مختلف هستند.

تاریخچه‌ی استفاده از ژلاتین به‌عنوان یک پوشش خوراکی در دهه‌ی ۱۹۶۰ به خوبی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج آن به صورت الگوی اختراع[۳] که عموماً در ارتباط با صنایع داروسازی بود، منتشر شد (Nurhanani*et al*., 2012) اما مجدداً در سال‌های اخیر این ماده

۱ و ۲- به ترتیب دانشیار و دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email:sedaghat@yahoo.com)

3 Patent

مورد توجه ویژه محققین در بحث فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی قرار گرفته است. ارزان و در دسترس بودن، زیست‌تخریب‌پذیری، قابلیت خوب آن در ساخت فیلم و پوشش‌خوراکی، ژلاتین را به یکی از محبوب‌ترین مواد سازنده فیلم و پوشش‌های خوراکی بدل کرده است.

ژلاتین پوشش بسیار خوبی در برابر اکسیژن و مواد معطر است. با اصلاح شبکه پلیمری ژلاتین از طریق پیوند عرضی[1] می‌توان زنجیره‌ی پلیمری ژلاتین را بهبود و نفوذپذیری آن در برابر اکسیژن را بیش‌از پیش کاهش داد. در سال‌های اخیر اثر دی‌آلدهیدکربوکسی‌متیل‌سلولز بعنوان عامل پیوند عرضی در ساختار فیلم پروتئینی ژلاتین (Liu *et al.*, 2012) و در استفاده از کربوکسی‌متیل‌سلولز در پیوند با ژلاتین و کلاژن در صنعت پزشکی (Leonardis*et al.*, 2010) مورد بررسی قرار گرفته است، با این حال استفاده از کربوکسی‌متیل‌سلولز در ترکیب با ژلاتین بعنوان پوشش خوراکی کم‌تر مورد پژوهش بوده است. هدف از این پژوهش استفاده از این ماده در ساختار پوشش خوراکی ژلاتین و تهیه‌ی یک پوشش مرکب برای جلوگیری از افزایش اسیدهای چرب آزاد و بهبود پایداری اکسایشی پسته‌ی برشته، مطالعه‌ی تأثیر پوشش‌های خوراکی بر ویژگی‌های حسی محصول و تحقیق تأثیر شرایط ذخیره‌سازی بر عملکرد این پوشش‌ها است.

مواد و روش

مواد

مواد اولیه مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از:

پسته‌ی برشته شده (فرایند برشته کردن پسته تحت دمای ۱۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه انجام شد) واریته‌ی اوحدی تهیه شده از شرکت پستیژ (ایران، یزد- تفت)، ژلاتین گاوی نوع B خریداری شده از شرکت آریای مشهد، کربوکسی‌متیل‌سلولز (CMC) خریداری شده از شرکت سیگماآلدریچ آمریکا، گلیسرول (بعنوان پلاستی‌سایزر)، اسیدآسکوربیک (AA) بعنوان آنتی‌اکسیدان، همگی خریداری شده از شرکت مرک آلمان.

محلول پوشش

پنج فرمولاسیون مورد پژوهش در این مقاله مطابق با جدول ۱ بود. پودر ژلاتین (۴ درصد وزنی/حجمی آب) و گلیسرول (۳۰ درصد وزنی/وزنی پودر ژلاتین) به آب دیونیزه اضافه و با هم‌زن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد هم زده شد (Nurhanani*et al.*,2012). برای تهیه‌ی سوسپانسیون آبی کربوکسی‌متیل‌سلولز نیز پودر CMC (۱ درصد وزنی/ حجمی آب) و گلیسرول (۳۰ درصد وزنی/ وزنی پودر کربوکسی‌متیل‌سلولز) با آب دیونیزه مخلوط شد. این سوسپانسیون تا دمای جوش حرارت داده شده و در این دما به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد و سپس برای مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هم‌زده شد (Oluwaseun*et al.*, 2013). پوشش ژلاتین-کربوکسی‌متیل‌سلولز نیز با حل‌کردن ۴۰ گرم ژلاتین، ۱۰ گرم کربوکسی‌متیل‌سلولز وگلیسرول (۳۰ درصد وزنی/وزنی مواد پلیمری) در یک لیتر آب تهیه شدو به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد هم‌زده شد.

بعد از خنک شدن محلول‌های پوشش تا دمای محیط آنتی‌اکسیدان اسیدآسکوربیک به میزان ۱ درصد وزنی/ حجمی محلول به آن‌ها افزوده شد.

جدول۱-تیمارهای مورد استفاده در این پژوهش

کد پوشش	ژلاتین	کربوکسی‌متیل‌سلولز	اسیدآسکوربیک
TCO	-**	-	-
TA	-		٪۱ w/v
TGA	٪۴ w/v	-	٪۱ w/v
TCA	-	٪۱ w/v	-
TCGA	٪۴ w/v	٪۱ w/v	٪۱ w/v

* غلظت بر پایه محلول پوشش در نظر گرفته شده است.

** خط تیره (-) به‌معنی عدم استفاده از پوشش یا آنتی‌اکسیدان است.CO: نمونه‌ی شاهد. G: ژلاتین C: کربوکسی‌متیل‌سلولز A: اسیدآسکوربیک. w/v: نسبت وزنی/حجمی

شیوه‌ی پوشش‌دهی

پوشش‌دهی نمونه‌ها به روش غوطه‌وری[2]صورت گرفت (Abdul Haq*et al.*, 2013). نمونه‌ها در آون ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک شدند. معیار اتمام فرایند خشک شدن رسیدن رطوبت به حد استاندار پسته (استاندارد ملی‌ایران شماره‌ی ۱۵، ۱۳۷۸) یعنی ۳٪ بود.

بسته‌بندی و شرایط نگهداری نمونه‌ها

بسته‌بندی پسته‌ها در کیسه‌های پلاستیکی سه لایه‌ی BOPP/Al/CPP[3] به ضخامت ۸۰ میکرون در سه تکرار انجام شد. نمونه‌ها بعد از کدزنی در شرایط نگهداری تسریع شده در دو دمای ۳۵ و ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ ماه نگهداری شدند (Crop life, 2009).

1 Cross linking

2 Immersion

3 Biaxial Oriented Polypropylene (BOPP)/Aluminum/ Cast Polypropylene (CPP)

استخراج روغن پسته

جهت انجام اندازه‌گیری اندیس پراکسید و تعیین درصد اسیدهای‌چرب‌آزاد روغن‌گیری از پسته به روش استخراج سرد انجام شد (Kang*et al*., 2013).

اندازه‌گیری اسیدهای چرب آزاد

میزان اسیدهای چرب آزاد به‌عنوان معیاری از میزان لیپولیز پسته به روش حلال سرد با استفاده از شناساگر[1] و با ۲ گرم آزمونه انجام شد (استاندارد ملی ایران شماره‌ی ۴۱۷۸، ۱۳۹۰).

اندازه‌گیری شاخص پراکسید (PV)

اندازه‌گیری این شاخص به روش فدراسیون بین‌المللی لبنیات (IDF) و با استفاده از اسپکتروفتومتر سری UV ۲۱۰۰ (model: Cole Parmer Instruments Company, Court Vernon Hills, USA) و در طول موج جذبی ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و بر اساس میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم روغن گزارش شد. این روش قادر است عدد پراکسید را با دقت ۰/۱ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم روغن اندازه‌گیری کند(Semb, 2012).

اندازه‌گیری درصد رطوبت

درصد رطوبت پسته طبق استاندارد تعریف شده برای اندازه‌گیری میزان رطوبت خشکبار برآورد شد(استاندارد ملی ایران شماره‌ی ۶۷۲، ۱۳۷۵)

آزمون بافت

سختی[2] بافت حداکثر نیروی لازم در طی آزمون فشاری است. سختی دستگاهی پسته‌ها توسط دستگاه آنالیز بافت[3] اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمایش ۱۵ نمونه مغز پسته فاقد هر نوع نقص از هر تیمار با در نظر گرفتن دستورالعمل دستگاه مورد آزمون قرار گرفتند. آزمون بافت بر اساس تست فشاری تک سیکله با پروب استوانه‌ای[4] به قطر ۲۰ میلی‌متر و با سرعت پروب ۵۰ میلی‌متر در دقیقه صورت گرفت.

میزان فشردگی نمونه به اندازه ۵۰٪ قطر پسته در نظر گرفته شد (مقدار حرکت پروب پس از تشخیص نمونه ۴-۳ میلی‌متر بود). نقطه ماکزیمم اولیه در نمودار نیرو-زمان مؤید میزان سختی (نیوتن) است (Nikzadeh&Sedaghat, 2008).

1 Cold solvent method using indicator
2 Hardness
3 Texture analyzer (model: Universal, Hounsfield –H5K model, UK)
4 Cylinder probe

ارزیابی حسی

پسته‌ها توسط ۵۰ ارزیاب حسی (۲۵ زن و ۲۵ مرد) نیمه‌آموزش دیده و با استفاده از مقیاس هدونیک توصیفی ۵ نقطه‌ای (۱= خیلی بد، ۲= بد، ۳= متوسط، ۴= خوب، ۵= بسیار خوب) انجام شد. ارزیابان حسی با رنج سنی ۴۰-۲۳ سال و از بین ۶۵ ارزیاب انتخاب شدند.

معیار انتخاب گروه ارزیابان حسی تشخیص ۴ طعم اصلی، عدم داشتن حساسیت غذایی، عدم استعمال سیگار، تمایل به تست پسته و در دسترس بودن در طی عملیات آموزش و ارزیابی بود. آموزش ارزیاب‌ها به صورت گروهی (چهار گروه ۱۰- ۱۵ نفره) صورت گرفت. و در یک جلسه دو ساعته اهمیت آزمون، شیوه انجام ارزیابی، تعریف خصوصیات مدنظر تشریح شد. در مورد هر یک از مولفه‌های آزمون بحث و تبادل نظر صورت گرفت و و در نهایت مشخصه‌های سفتی (نیروی اولیه لازم برای نفوذ در دانه در گاز زدن اولیه)، تندی (طعم حاصل از روغن اکسیده شده یا کهنگی)، طعم کلی (قدرت کلی تمام ویژگی‌های طعمی در کنار هم یا به عبارتی مقایسه نسبی از طعم پسته‌ی مورد آزمون با طعم مورد انتظار از پسته) رنگ (میزان مطلوبیت رنگ مغز پسته) و پذیرش کلی پسته مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای ارزیابی سفتی امتیاز دهی از سفتی بسیار کم (ترد) با امتیاز ۱ تا بسیار سفت (امتیاز ۵) و طعم تندی نیز از بسیار کم (امتیاز ۱) تا بسیار زیاد (امتیاز ۵) در نظر گرفته شد (Meilgaard*et al*., 2008; AbdulHaq*et al*., 2013).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمون در قالب طرح پایه‌ی کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل و در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده با استفاده از آنالیز واریانس توسط نرم‌افزار Minitab 16 و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکیو در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P\leq ۰/۰۵$) انجام گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 رسم شد.

نتایج و بحث

شاخص پراکسید (PV)

شاخص پراکسید شناساگر مناسبی برای تشخیص مراحل اولیه اکسیداسیون است (Shahidi& Zhang, 2005). اعداد متفاوتی برای حداکثر مقدار مجاز شاخص پراکسید در دانه‌های آجیلی ذکر شده است. برای مثال استاندارد نیچرلند (۲۰۰۰) و استاندارد ملی ایران مقدار ۱ $meq.O_2/kg$، کانر (۲۰۰۷) ۲ $meq.O_2/kg$ و استاندارد یونیسف (۲۰۰۲) ۵ $meq.O_2/kg$ را برای این شاخص عنوان کرده‌اند (Natur Land, 2000; Unecef Standard, 2002; Canner, 2007). شکل ۱ تأثیر پوشش‌های خوراکی مختلف را بر روی شاخص پراکسید در طول زمان نشان می‌دهد. پوشش خوراکی تأثیر معنی‌داری

بر کاهش روند اکسیداسیون در پسته‌ی برشته داشت. بیش‌ترین تـأثیر در بین پوشش‌های خوراکی را پوشش ژلاتین- کربوکسی‌متیل‌سلولز- اسیدآسکوربیک (۱/۵۸ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم محصـول) داشت و در مقایسه پوشش ژلاتین و کربوکسـی‌متیـل‌سـلولز، پوشـش ژلاتینـی در کنتـرل اکسیداسـیون دارای مزیـت بـوده اسـت. دلیـل اثرگذاری بیشتر پوشش پروتئینی نسبت به کربوهیـدراتی را مـی‌تـوان نفوذپذیری پایین پوشش‌های پروتئینی از جمله ژلاتین در برابـر نفـوذ اکسیژن دانست که این امر نیـز ناشـی از شـبکه‌ی مـنظم و منسـجم پـروتئین‌هاسـت (Baldwin 2007). بهتـرین عملکـرد را در کنتـرل شـاخص پراکسـید پوشـش مرکـب ژلاتـین-کربوکسـی‌متیـل‌سـلولز (TCGA) داشت. حضور کربوکسی‌متیل‌سلولز بعنوان یک عامل پیوند عرضی باعث ایجاد انسجام بیش‌تر در ساختار و متعاقباً عملکـرد بهتـر پوشش شد (Liu *et al*., 2012; Leonardis*et al*., 2010).

در دمای ۳۵°C، تفاوت معنی‌داری بین نمونـه‌ی شـاهد بـا سـایر تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵)، بطوری که میانگین عدد پراکسـید در نمونه‌ی شاهد ۲/۱ بود در حالی که ایـن مقـدار در نمونـه‌هـای دارای پوشش بطور معنی‌داری کم‌تر و به طورمتوسط برای نمونه‌های TCA، TGA، TCGA به ترتیب ۱/۴۲۴، ۱/۱۶۷۵ و ۰/۹۴۴ میلی‌اکـی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم بود (شکل ۱) محققان دیگری نیز به بررسـی اثـر پوشش‌های مختلف خوراکی بـر پایـدار اکسایشـی دانـه‌هـای آجیلـی پرداختند که نتایج این پژوهش با نتایج این محققین مطابقـت داشـت (Min &Krochta, 2007; Goungaet *al*., 2008; Atareset *al*., 2011; Mehyar*et al,* 2012; Abdul Haq*et al*., 2013).

Min و Krocht (۲۰۰۷) و Atares و همکـاران (۲۰۱۱) گـزارش کردند که افزودن اسیدآسکوربیک به پوشش خوراکی بطور معنی‌داری باعث کاهش روند اکسیداسیون می‌شوند. این امر را نمی‌توان تنهـا بـه طبیعت شیمیایی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی ایـن ترکیبـات نسـبت داد، افزودن این ترکیبـات مـی‌توانـد باعـث فعـل و انفعـالات در سـاختار ماتریکس پوشش شده و با ایجاد پیوند عرضی در پوشش باعث بهبـود سـاختار و کـاهش انتقـال اکسـیژن از میـان پوشـش شـود (Min &Krochta, 2007; Atareset *al*., 2011).

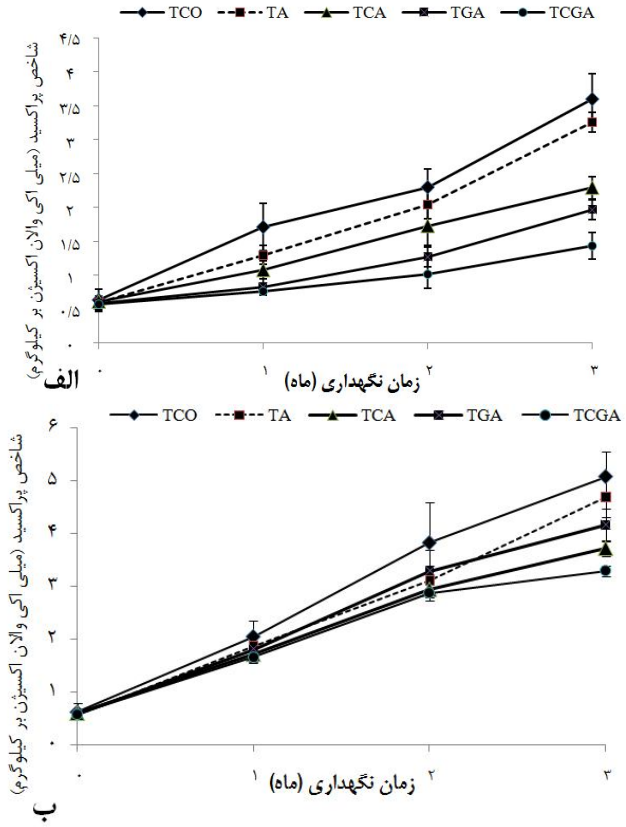
با بررسی اثر متقابل دما و پوشش خوراکی مشخص شد، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا پایان ماه دوم نگهداری تفاوت معنی‌داری بـین نمونه‌ی TA و TGA وجود نداشت، در این دمـا پوشـش ژلاتـین بـه دلیل باز شدن منافذ نتوانست اثـر ممانعـت‌کننـدگی خـود را در برابـر اکسیژن داشته باشد، اما در ماه سوم بطـور معنـی‌داری از اثـر بخشـی تیمار TA کاسته شد، درحالی‌که حضور آنتی‌اکسیدان در قالب پوشـش ژلاتینی مدت زمان بیش‌تری اثربخشی خود را حفظ کرد. ژلاتـین بـه دلیل ساختار مارپیچی ویژه یکی از بهترین حامل‌هـای مـواد بیواکتیـو محسوب می‌شود و یکـی از مرسـوم‌تـرین مـواد بـرای ریزپوشـانی و کپسوله کردن مواد زیست‌فعال محسوب مـی‌شـود (NurHanani*et al*., 2012). بـه همـین دلیـل نیـز توانسـت محافظـت خـوبی از آنتی‌اکسیدان‌ها در برابر حرارت به‌عمل آورد و به این ترتیب در پایـان ماه سوم نگهداری در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ی TA با TGA دیده شد. بسیاری از محققین از دمـا بـه‌عنـوان یک فاکتور بحرانی بر ویژگی ضداکسایشـی پوشـش‌هـا و فـیلم‌هـای خوراکی به ویژه پوشش‌های پروتئینی یاد کرده‌اند.آن‌ها بیان داشته‌انـد که افزایش دمـا باعـث افـزایش حرکـت پلیمرهـا و متعاقبـاً افـزایش نفوذپذیری پوشش می‌شود (Baldwin, 2007). برای نمونـه میـت و کراچتا (۱۹۹۷) دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را در مورد پروتئین آب‌پنیـر دمای بحرانـی اعـلام کردنـد (Mate &Krochta, 1997). مهیـار و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند پوشش پـروتئین آب پنیـر در دمـای ۵۰ درجه سـانتی‌گـراد اثربخشـی کـم‌تـری نسـبت بـه دمـای ۲۵درجـه سـانتی‌گـراد دارد (Mehyar*et al*, 2012). وجـود پوشـش کربوکسی‌متیل‌سلولز به تنهایی یا در ترکیب با ژلاتین هم‌چنان بطـور معنـی‌داری توانسـت پسـته را از اکسـایش محافظـت کنـد .مهیـار و همکاران (۲۰۱۲) نیز عملکرد پوشش کربوهیدراتی نشاسته نخود را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در کاهش روند اکسایش بهتـر از پـروتئین آب‌پنیر برآورد کردند. در این دما نیز بهترین عملکرد مربوط به پوشش مرکب کربوکسی‌متیل‌سلولز- ژلاتین بود. با این حال در این دمـا بـین دو پوشش TCA و TCGA تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

اسیدچرب آزاد

اسیدهای چرب‌آزاد نتیجه‌ی هیـدرولیز آنزیمـی تـری‌گلیسـریدها هستند. این واکنش توسط گرما و رطوبت کاتـالیز مـی‌شـود (Brain &Yada, 2009). آنزیم‌های لیپولتیک درست در زیر پوسته‌ی نـازک پسته واقع شده‌اند و تا زمانی که سلول‌های پسته آسیب ندیـده باشـند نمی‌توانند به چربی حمله کنند، امـا از آن‌جـایی کـه حـرارت در طـی برشته کردن سبب ایجاد تغییرات فیزیکی در سلول می‌شـود افـزایش معنی‌داری در اسـیدچرب آزاد در پسـته‌هـای برشـته دیـده مـی‌شـود (Ozdemir, 2001).

بررسی اثر پوشش بر روی این شاخص نشان داد، بین نمونـه شـاهد و چهـار فرمولاسـیون دیگـر تفـاوت معنـی‌داری (P≤۰/۰۵) وجـود دارد، نمونه‌های TGA و TCA نسبت به نمونه‌ی شاهد بطـور معنـی‌داری محتوی اسید چرب‌آزاد کم‌تری بوده با ایـن حـال بـین ایـن دو تیمـار تفاوت معنی‌داری دیده نشد (P>۰/۰۵) و نمونـه‌هـای TCGA بطـور معنی‌داری حاوی اسیدچرب‌آزاد کم‌تری نسبت به سایر نمونه‌ها بودنـد. به این ترتیب متوسط بـیش‌تـرین میـزان اسـیدچرب آزاد در نمونـه‌ی شـاهد (۰/۳۹۳۵) و کـم‌تـرین آن در نمونـه‌ی TCGA (۰/۲۶۹۶) مشاهده شد. پوشش‌های خوراکی ماده‌ی غذایی و هم‌چنین ترکیبـات فعال موجـود در پوشـش را در برابـر رطوبـت و دمـا حفـظ مـی‌کننـد (Baldwin, 2007) لذا استفاده از پوشش خوراکی حاوی آنتـی‌اکسـیدان

سرعت تشکیل اسیدچرب‌آزاد را در پسته کاهش داد (شکل ۲). مهیار و همکاران (۲۰۱۲) پوشش پروتئین آب‌پنیر و نشاسته‌ی نخودفرنگی را بر روی گردو و دانه‌ی صنوبر موجب کاهش روند صعودی تولید اسیدهای چرب آزاد دانستند (Mehyar*et al*., 2012).



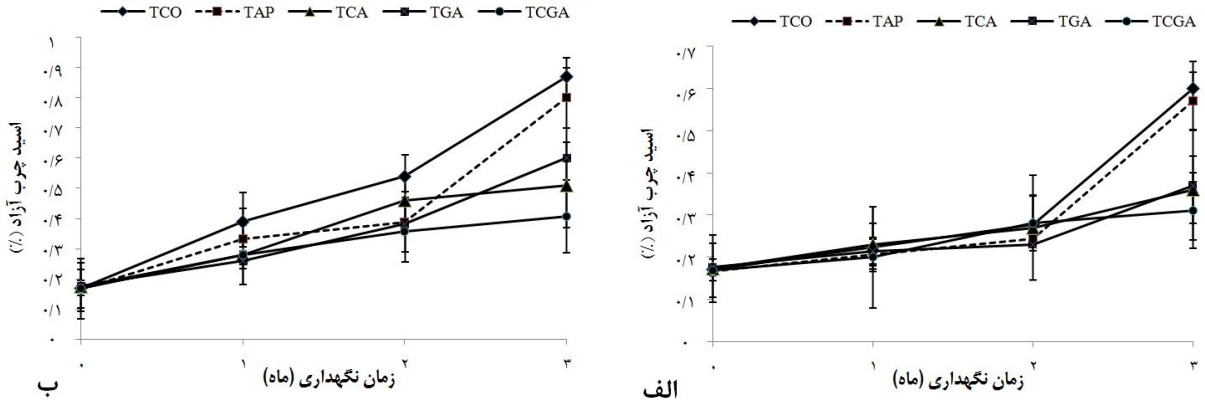
شکل ۱- اثر پوشش خوراکی بر شاخص پراکسید پسته‌ی برشته در دو دمای الف) ۳۵°C و ب) ۵۰ °C

نتایج پژوهش نیک‌زاده و صداقت (۱۳۸۸) نیز نشان داد میزان اسیدچرب‌آزاد در نمونه‌های حاوی ۱ و ۲ درصد اسیدآسکوربیک، در طی زمان نگهداری کم‌تر از نمونه‌ی شاهد بوده است. زیرا حضور آنتی‌اکسیدان در این نمونه‌ها مانع از ادامه اکسیداسیون و شرکت اسیدهای چرب‌آزاد در این واکنش شده است (نیک‌زاده و صداقت، ۱۳۸۸). طاهری و همکاران (۲۰۱۲) اعلام کردند افزودن اسیدآسکوربیک باعث کاهش معنی‌داری در مقدار اسیدهای چرب آزاد در ماهی طی دوره‌ی نگهداری شد (Taheri*et al*., 2012). حداکثر مقدار مجاز برای این اندیس در دانه‌های آجیلی در منابع مختلف بین ۱-۰/۷ درصد تعریف شده است (Natur Land, 2000; Unecef Standard, 2002). در صورتی این مقدار را ۰/۷ در نظر بگیریم در دمای ۳۵°C هیچ یک از نمونه‌ها از محدوده‌ی آستانه‌ی پذیریش عبور نکرده‌اند. اما در دمای ۵۰°C نمونه‌ی شاهد و TA در پایان ماه سوم نگهداری از این مرز عبور کرده‌اند.

رطوبت

نتایج نشان داد رطوبت در نمونه‌های دارای پوشش (TGA، TCA و TCGA) بطور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌ی شاهد و TA بود (P<۰/۰۵). از آن‌جایی که فیلم‌ها و پوشش خوراکی نقش ممانعت‌کنندگی در برابر نقل و انتقال گازها و رطوبت دارند، میزان روند کاهش رطوبت در نمونه‌های دارای پوشش خوراکی بطور معنی‌داری کندتر از نمونه‌ی TA بود (شکل ۳).

در مقایسه پوشش ژلاتین و کربوکسی‌متیل سلولز پوشش CMC نفوذپذیری کم‌تری به رطوبت داشت. همچنین حضور کربوکسی‌متیل‌سلولز و ژلاتین در کنار هم نیز به دلیل ایجاد پیوستگی و استحکام ساختار پوشش TCGA نسبت به پوشش ژلاتین (TGA)به رطوبت نفوذناپذیرتر شده بود.



شکل ۲- اثر پوشش خوراکی بر میزان اسیدچرب‌آزاد پسته‌ی برشته در دو دمای الف) ۳۵°C و ب)۵۰°C

همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، دما یک فاکتور بحرانی در نفوذپذیری پوشش‌های خوراکی است. با افزایش دما حرکت پلیمرها افزایش و متعاقباً منافذ پوشش بازتر شده و از خواص ممانعت کنندگی پوشش در برابر گازها و رطوبت بطور معنی‌داری کاسته می‌شود. دلیل دیگر این امر می‌تواند مهاجرت پلاستی‌سایزر[1] و افزایش نفوذپذیری پوشش نسبت به رطوبت باشد (Baldwin, 2007)، بطوری که در دمای ۵۰°C در پایان ماه دوم و سوم نگهداری به وضوح لکه‌های سفید روی پسته و به‌ویژه پسته‌های پوشش‌داده شده با ژلاتین دیده شد که احتمالاً ناشی از مهاجرت پلاستی‌سایزر و شکننده شدن ساختار پوشش بود.

نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج محققین دیگر نیز هم‌خوانی داشت. از جمله Lee و همکاران (۲۰۰۲) سفتی بیش‌تر بادام‌زمینی‌های برشته و پوشش‌داده شده با پروتئین آب‌پنیر را به دلیل محتوی رطوبت بیش‌تر این بادام‌ها عنوان کردند. Baldwin و Wood (۲۰۰۶) نیز پوشش‌های کربوکسی‌متیل‌سلولز و پروپیل‌هیدروکسی‌سلولز را باعث سفتی بیش‌تر گردوی آمریکایی دانستند. مهیار و همکاران (۲۰۱۲) نیز پوشش ایزوله‌ی پروتئین‌آب‌پنیر و نشاسته‌ی نخودفرنگی را مانع از دست رفتن رطوبت گردو دانستند. هم‌چنین مقصودلو و همکاران (۱۳۹۱) نیز پوشش کیتوزان را در ثابت ماندن میزان رطوبت پسته مؤثر اعلام کردند.

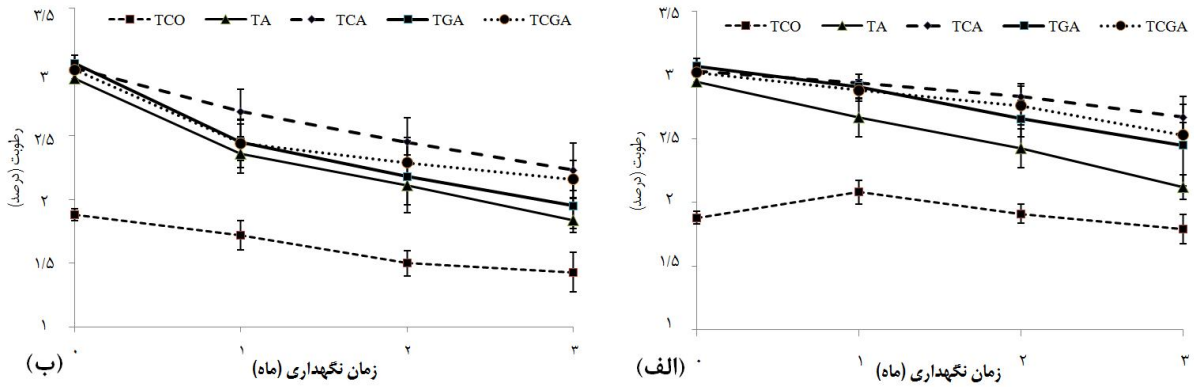
نتایج نشان داد رطوبت نمونه‌ی شاهد در پایان ماه اول نگهداری در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بطور معنی‌داری بالاتر از زمان صفر بود ($P<0/05$). Kita و Figiel (۲۰۰۷) نیز در بررسی خود بر روی گردوی برشته و گردوی خام خشک اعلام کردند که به دلیل محتوی رطوبت پایین گردو بعد از برشته شدن فشار بخار آب در پسته‌ی برشته شده نسبت به محیط اطراف پایین‌تر بوده و لذا رطوبت محیط را جذب می‌کند. در حالی که در گردوی خام خشک به دلیل محتوی رطوبتی بیش‌تر فشار بخار آب در این نمونه‌ها بالاتر از محیط بوده و تمایل به از دست دادن رطوبت دارند، که این محققین میزان کاهش یا افزایش رطوبت به ویژگی‌های ممانعت‌کنندگی ماده‌ی بسته‌بندی وابسته دانستند. بنظر می‌رسد در این پژوهش نیز به دلیل محتوی رطوبتی بیش‌تر نمونه‌های پوشش‌دار این نمونه‌ها بر خلاف نمونه‌ی شاهد تمایل بیش‌تری به کاهش رطوبت نشان داده‌اند. هم‌چنین یافته‌های این پژوهش با نتایج نیک‌زاده و صداقت (۲۰۰۸) منطبق بود، آن‌ها اعلام کردند پسته بعد از برشته‌شدن کم‌ترین رطوبت را دارد و به تدریج بر میزان رطوبت آن‌ها افزوده می‌شود. عدالتیان و همکاران (۱۳۸۶) در شرایط دمایی تسریع شده روند تغییر رطوبت در پسته‌ی خام را در تمام ماه‌ها نزولی اعلام کردند که دلیل این اختلاف نتایج، تفاوت در ویژگی‌های پسته‌ی خام و برشته است.

سختی

بررسی اثر پوشش بر روی سختی دستگاهی پسته‌ها نشان داد پسته‌های نمونه‌های شاهد کم‌ترین سختی و پسته‌های نمونه‌ی TCA بیش‌ترین سختی را داشتند. به‌عبارتی حضور پوشش‌های خوارکی بطور معنی‌داری سختی را در پسته‌ی برشته بالا برد که این نتایج با نتایج محققین دیگر نیز هم‌خوانی داشت (Lee *et al*., 2002; Baldwin & Wood, 2006; Mehyar*et al*., 2012). آن‌ها دلیل سفتی دانه‌های آجیلی حاوی پوشش خوراکی را محتوی رطوبت بیش‌تر این دانه‌ها عنوان کردند. اما مقصودلو و همکاران (۱۳۹۱) نتایج متفاوتی با نتایج این پژوهش به دست آوردند آن‌ها هیچ تأثیر معنی‌داری را بین بافت نمونه‌های پسته‌ی پوشش داده شده با کیتوزان و نمونه‌های شاهد مشاهده نکردند، آن‌ها عنوان کردند از آن‌جایی که رطوبت همه تیمارها در محدوده‌ی رطوبت نمونه‌ی شاهد بود، در بافت آن‌ها تغییر معنی‌داری دیده نشده است.

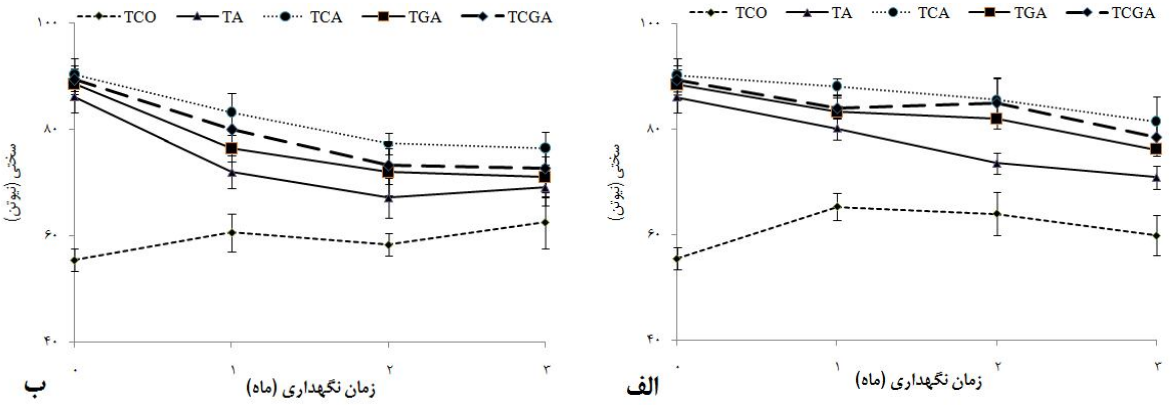
1 Plasticizer

در شکل ۴ اثر پوشش‌های مختلف طی زمان نگهداری در دو دما ۳۵°C و ۵۰ ترسیم شده است. در زمان صفر بین نمونه‌ی شاهد و سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت با این حال تفاوت بین چهار تیمار مختلف در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود. در پایان ماه اول در حالی که همگام با افزایش رطوبت سختی در نمونه‌های شاهد افزایش یافت سایر نمونه‌ها نیز با کاهش رطوبت کاهش سختی را نشان دادند. نیک‌زاده و صداقت (۲۰۰۸) نیز بیان داشتند پسته بعد از برشته شدن کم‌ترین رطوبت و سختی را دارد و به مرور زمان بر سختی آن افزوده می‌شود. اثر کاهش سختی با کاهش رطوبت در مطالعات مختلفی صورت گرفته است.



شکل ۳- اثر پوشش خوراکی بر رطوبت پسته‌ی برشته در طی زمان نگهداری در دمای الف) ۳۵°C و ب) ۵۰ °C

Demir و Cronin (۲۰۰۴) در بررسی کنتیک تغییر بافت در نمونه‌ی برشته شده و خام فندق به این نتیجه رسیدند که روند سختی در فندق خام رو به کاهش بوده در حالی که در فندق برشته به دلیل فشار بخار آب پایین فندق و گرایش به جذب رطوبت از محیط سختی افزایش یافته است. در پایان ماه اول نگهداری در دمای ۳۵°C اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ی TA و نمونه‌های دارای پوشش وجود داشت از آن‌جایی که پوشش خوراکی مانع نقل و انتقال رطوبت به داخل دانه و خارج از آن است رطوبت در این دانه‌ها تمایل کم‌تری برای خروج داشته و لذا از سختی بیش‌تری نیز برخوردار بودند این نتایج نیز هماهنگی زیادی با میزان رطوبت داشت. این روند در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تا پایان ماه سوم نگهداری کم و بیش ادامه داشت اما در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در ماه سوم نگهداری در نمونه‌ی TA و شاهد سختی افزایش یافت. نیک‌زاده و صداقت (۲۰۰۸) بیان کردند سختی پسته‌ی برشته شده در طول دوره‌ی نگهداری از سویی می‌تواند به دلیل افزایش محتوی رطوبت محصول باشد و از سوی دیگر واکنش فرآورده‌های تخریبی حاصل از اکسیداسیون چربی‌ها هم‌چون پراکسیدو رادیکال‌های آزاد چربی با ویتامین‌ها، آمینواسیدهای و پروتئین‌ها در کنار بد طعمی باعث ایجاد کهنگی و سختی بافت مغزها می‌شود (واکنش لیزین و ترئونینبا اسید لینولئیک اسیدشده نمونه‌ای از این واکنش‌هاست (شکل ۴). Thakur و همکاران (۲۰۱۱) نیز اعلام‌کردند بسته به هدایت حرارتی ماده‌ی بسته‌بندی در ماده‌ی غذایی احتمال واکنش‌های تجزیه‌ای مختلفی وجود دارد که بر این مبنا احتمال تغییر در بافت و ویژگی‌های ماده‌ی غذایی وجود دارد. در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد وجود پوشش نتوانسته است مانعی در برابر خروج رطوبت در پوشش TGA باشد و لذا در پایان ماه نگهداری اول هیچ تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های دارای پوشش ژلاتینی و TA دیده نشد. بین سختی در پایان ماه دوم و سوم بین نمونه‌های TGA نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشته است در صورتی که رطوبت طی این دو ماه کاهش معنی‌داری داشته است. به‌نظر می‌رسد دلیل این امر افزایش اکسایش و تأثیر فرآورده‌های تخریبی ناشی از آن بر بافت محصول باشد. عدالتیان و همکاران (۱۳۸۶) نیز روند سختی در پسته‌ی خام را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بر خلاف دو دمای ۲۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد افزایشی گزارش کردند. در پوشش TCA به دلیل رطوبت بیش‌تر سختی نیز بیش‌تر بود. در مورد پوشش‌های حاوی CMC و ژلاتین احتمالاً به دلیل ساختار منسجم‌تر پوشش و محافظت پسته‌ها در برابر اکسیژن علی‌رغم رطوبت بیش‌تر پسته‌ها نسبت به TGA سفتی پسته‌ها تفاوت معنی‌داری با گروه TGA نداشتند و حتی در ماه سوم سفتی بطور معنی‌داری کم‌تر از ماه دوم بود.



شکل ٤- اثر پوشش خوراکی بر سختی پسته‌ی برشته طی زمان نگهداری در دمای الف) ۳۵°C و ب) ۵۰ °C

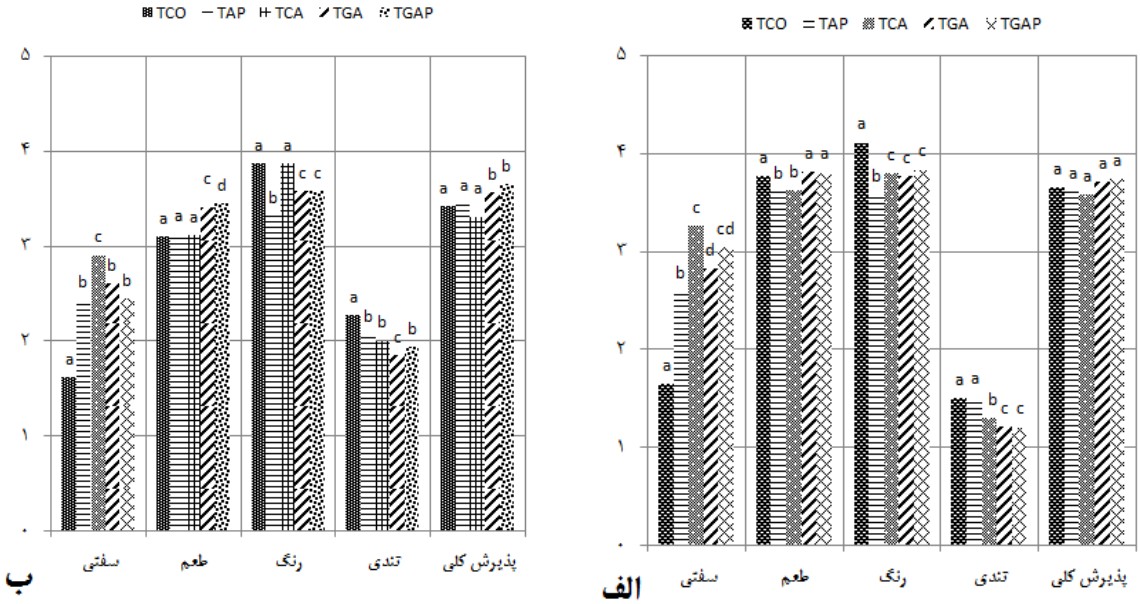
آزمون حسی

تندی: بررسی اثر پوشش خوراکی بر روی طعم روغنی (تندی) پسته‌های برشته‌شده نشان داد تفاوت بین نمونه‌ی شاهد و سایر نمونه‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار است، بررسی اثر تیمارهای مختلف بر فاکتور تندی پسته در دو دمای مختلف در شکل ۵ ترسیم شده است. در دمای ۵۰°C بطور معنی‌داری شاخص تندی بالاتر بود و تنها بین نمونه‌ی TGA و TCGA سایر نمونه‌ها تفاوت معنی‌دار بود. اما در دمای ۳۵ °C اختلاف بین نمونه‌ی شاهد با سایر نمونه‌ها معنی‌دار بود و کم‌ترین امتیاز نیز مربوط به نمونه‌ی TCGA بود. استفاده از پوشش خوراکی به ویژه پوشش خوراکی مرکب ژلاتین- کربوکسی‌متیل‌سلولز توانست به‌طور معنی‌داری (P≤۰/۰۵) میزان طعم تندی را در پسته پایین نگه دارد. محققین دیگر نیز نتایج مشابهی را در مورد طعم تندی در بادام‌زمینی برشته و دانه‌ی صنوبر بدست آوردند (Abdul Haq*et al*., 2013; Mehyar*et al*., 2012).

طعم: بررسی اثر متقابل زمان نگهداری و نوع پوشش بر روی امتیاز حسی طعم در پسته‌های برشته شده نشان داد که در زمان صفر و پایان ماه اول نگهداری بیش‌ترین امتیاز حسی در دمای ۳۵°C مربوط به نمونه‌ی شاهد بود، اما به تدریج و با افزایش اکسیداسیون و طعم‌های متعاقب آن از امتیاز حسی پسته‌های نمونه‌ی شاهد کاسته شد و به این ترتیب در پایان زمان نگهداری دوم اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ی شاهد و نمونه‌های پوشش داده شده با ژلاتین و کربوکسی‌متیل‌سلولز از نظر طعم دیده شد. بنابر نظر ارزیاب‌های حسی در پایان ماه سوم نگهداری در نمونه‌ی شاهد و به ویژه در دمای ۵۰°C طعم تلخی در پسته‌ها دیده شد. در عین حال در نمونه‌های پوشش‌داده شده با کربوکسی‌متیل‌سلولز نیز امتیاز حسی در پایان ماه سوم بطور معنی‌داری کاهش یافت. به‌نظر می‌رسد دلیل این تغییر طعم واکنش‌های شیمیایی ناشی از تجزیه کربوهیدرات‌ها و واکنش‌های تجزیه‌ای اسیدآسکوربیک باشد. نتایج مشابهی نیز در مورد تغییر طعم گردوی آمریکایی پوشش داده شد با کربوکسی‌متیل سلولز و هیدروکسی‌متیل‌سلولز نیز گزارش شد (Baldwin & Wood, 2006). این نتایج همچنین با نتایج Grossoو Resurreccion (۲۰۰۲) بر روی بادام‌زمینی برشته شده و نتایج Abdul Haq و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مورد دانه‌ی صنوبر و گردو پوشش داده شده با کربوکسی‌متیل‌سلولز دیده شد.

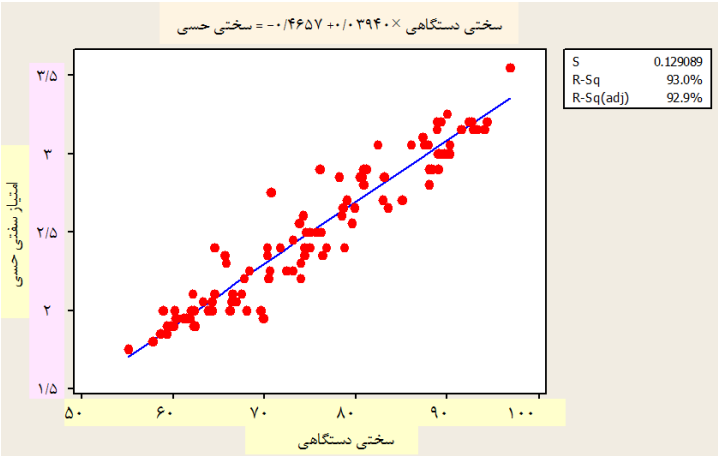
رنگ: نتایج نشان داد افزودن اسید آسکوربیک در قالب پوشش و بدون آن تأثیر معنی‌داری بر امتیاز رنگ پسته داشته است. افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به پوشش‌ها به جای افزودن مستقیم این مواد به محصول موجب رهاسازی کنترل‌شده‌ی این مواد شده و این ترکیبات را در برابر رطوبت، دما و دیگر آسیب‌های خارجی مصون نگاه می‌دارد و به این ترتیب پایداری و عملکرد آن‌ها بهبود می‌بخشد، به علاوه تا حدودی اثرات منفی برخی مواد بیواکتیو بر خصوصیات حسی را نیز کنترل می‌کند (Zhao & McDaniel, 2005). در این پژوهش نیز زمانی که از ترکیب آنتی‌اکسیدان اسیدآسکوربیک در قالب پوشش خوراکی بهره گرفته شد امتیاز حسی رنگ بطور معنی‌داری بیش‌تر از زمانی بود که این ترکیب بطور مستقیم بر روی محصول استفاده شد. نیک‌زاده و همکاران (۱۳۸۸) نیز امتیاز حسی رنگ در پسته‌های پوشش داده شده با آنتی‌اکسیدان اسید آسکوربیک کم‌تر از نمونه‌ی شاهد برآورد کردند. Min و Krochta (۲۰۰۷) با بررسی اثر پوشش پروتئین آب‌پنیر حاوی اسیدآسکوربیک بر روی رنگ بادام‌زمینی به این نتیجه رسیدند که حضور آنتی‌اکسیدان اسید آسکوربیک بر روی رنگ بادام‌زمینی‌های برشته شده تأثیرگذار است و نمونه را تیره‌تر ساخته و قرمزی این نمونه‌ها نیز بیش‌تر از نمونه‌ای بدون پوشش برآورد شد. آن‌ها این قرمزی را به خاطر تولید پیگمان قرمز حاصل از واکنش قهوه‌ای شدن مایلارد بین دهیدروآسکوربیک اسید و پروتئین آب‌پنیر عنوان کردند. مهیار و همکاران (۲۰۱۲) روی نمونه‌های پوشش داده شده با پروتئین آب‌پنیر و نشاسته‌ی نخود فرنگی در دانه‌ی صنوبر و

گردو نشان داد که رنگ نمونه‌های دارای پوشش بطور معنی‌داری با نمونه‌ی شاهد متفاوت است آن‌ها این تغییر رنگ را به رنگ زرد پوشش نسبت دادند (Mehyar*et al.*, 2012). Baldwin و Wood (۲۰۰۶) نیز تیره‌تر شدن گردوی آمریکایی را در اثر استفاده از پوشش کربوکسی‌متیل‌سلولز گزارش کردند.



شکل ۵- اثر پوشش خوراکی بر ویژگی‌های حسی پسته‌ی برشته در دو دمای الف) ۳۵°C و ب) ۵۰ °C

بافت: بررسی اثر پوشش خوراکی بر امتیاز حسی سفتی پسته در دو دمای ۳۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد در شکل ۵ آمده است. همان‌طور که مشخص است وجود پوشش باعث افزایش معنی‌دار سختی در پسته‌های برشته شده است. که در مورد دلایل احتمالی آن در قسمت سختی دستگاهی توضیحات لازم آورده شده است. همبستگی بین سفتی دستگاهی و حسی بسیار بالا (۰/۹۳) بود (شکل ۶).



شکل ٦- همبستگی میان داده‌های حسی و دستگاهی مربوط به سختی پسته‌ی برشته

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد پوشش‌های خوراکی ژلاتین- کربوکسی‌متیل‌سلولز حاوی اسیدآسکوربیک می‌تواند پوشش خوراکی بسیار مناسبی برای افزایش زمان ماندگاری پسته‌ی برشته و دانه‌های آجیلی مشابه باشد. در استفاده از پوشش‌خوراکی ژلاتین دما یک فاکتور بحرانی محسوب می‌شود. بطوری که حضور پوشش‌های خوراکی ژلاتین در دمای

۵۰°C به دلیل باز شدن منافذ پوشش و عدم توانایی در مهار اکسیژن نتوانست تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های شیمیایی محصول داشته باشد و حضور کربوکسی‌متیل‌سلولز در کنار ژلاتین بطور معنی‌داری به دلیل ایجاد پیوند عرضی و افزایش استحکام ماتریکس پوشش از تأثیر حرارت بر عملکرد پوشش کاست. پوشش ژلاتینی و کربوکسی‌متیل‌سلولز باعث افزایش معنی‌دار سختی پسته‌ها شد و بر روی رنگ پسته نیز تأثیر معنی‌داری داشت. با این حال این تفاوت‌ها باعث کاهش امتیاز پذیرش کلی محصول به زیر آستانه‌ی پذیرش نشد و پسته همچنان از مقبولیت مناسبی برخوردار بود. در مجموع می‌توان گفت پوشش‌های خوراکی ژلاتین- کربوکسی‌متیل‌سلولز- اسیدآسکوربیک می‌تواند به عنوان یک پوشش اقتصادی و در دسترس برای جلوگیری از فساد اکسایشی دانه‌های آجیلی عملکرد مناسبی داشته باشد.

قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد و مدیر عامل محترم شرکت آجین خاورمیانه (پستیژ) که حمایت مالی و بستر سازی انجام این پژوهش را برعهده داشتند سپاس‌گزاری می‌گردد. لازم به ذکر است این پژوهش در قالب طرح پژوهشی با کد ۲/۲۸۹۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه فردوسی به تصویب رسید.

منابع

عدالتیان، م.ر.، صداقت، ن. و شریف، ع.، ۱۳۸۶، تأثیردرجه حرارت، نوع بسته‌بندی و زمان نگهداری بر سفتی بافت پسته رقم اوحدی و مقایسه آن با فاکتورهای حسی، مجله پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۳ (۱)، ۷-۱.

مقصودلو، ع. و مقصودلو، ی.، ۱۳۹۲، تأثیر پوشش خوراکی کیتوزان با وزن‌های ملکولی و غلظت‌های مختلف بر واکنش‌های اکسایشی مغز پسته، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۳۲ (۱)، ۱۳۱-۱۲۱.

مقصودلو، ع.، مقصودلو، ی.، خمیری، م. و قربانی، م.، ۱۳۹۲، بررسی فعالیت ضدقارچی پوشش خوراکی کیتوزان و تاثیر آن بر جذب رطوبت و ویژگی‌های ارگانولپتیکی مغز پسته، نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی،۱ (۲)، ۹۸-۸۷.

مؤسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵،روش اندازه‌گیری رطوبت خشکبار، چاپ پنجم، استاندارد ملی ایران شماره ۶۷۲، مؤسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، تهران.

مؤسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷، پسته, ویژگی‌ها. تجدید نظر چهارم. استاندارد ملی ایران شماره ۱۵، مؤسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، تهران.

مؤسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۹۰، روغن‌ها و چربی‌های گیاهی و حیوانی، اندازه‌گیری عدد اسیدی و اسیدیته- روش آزمون، تجدید نظر اول، استاندارد ملی ایران شماره ۴۱۷۸، مؤسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، تهران.

نیک‌زاده، و. و صداقت ن.، ۱۳۸۸، بررسی اثرات دمای برشته کردن، فرمولاسیون و زمان ماندگاری بر ویژگیهای کیفی روغن پسته و خصوصیات ارگانولپتیکی آن، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۶(۳)، ۵۵-۴۶.

Roma, Italy, Tel +39 06 588961, Fax +39 06 58896023, Email mleonardis@virgilio.it

Abdul Haq, M., JunaidAlam, M. &Hasnain, A., 2013, Gum Cordia, A novel edible coating to increase the shelf life of Chilgoza(Pinusgerardiana). LWT - *Food Science and Technology*, 50, 306-311.

Atares, L., Perez-Masia, R. &Chiralt, A., 2011,The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated roasted almonds. *Food Engineering*, 104, 649–656.

Baldwin E.A., 2007, Surface treatments and edible coatings in food preservation. In: Rahmanm M.S. (ed.), Handbook of Food Preservation, Boca Raton. *CRC Press, Florida*- USA.

Baldwin, E. & Wood, B., 2006, Use of edible coating to preserve pecans at room temperature.*HoRTscience*, 41(1), 188-192.

Brain, C.B. &Yada, R.Y., 2009, Food biochemistry. In: Campbell-Platt G. (ed), *Food science and technology*. Wiley-BlackWell, UK, West Sussex

Crop Life International, 2009, Guidelines for Specifying the Shelf Life of Plant Protection. Products Technical Monograph, 17(2), 3-9.

Demir, A.D., & Cronin, K., 2004,The thermal kinetics of texture change and the analysis of texture variability for raw and roasted hazelnuts. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 371-383.

Department of Aesthetic Medicine, Fisiobios, Roma, Italy;

Department of Plastic Surgery, Núcleo de PlásticaAvançada, São Paulo, SP, Brazil;

Department of Plastic Surgery, Consultorio de CirurgiaPlastica, *Criciuma*, SC, Brazil

Correspondence: Mauro Leonardis, Salvator Mundi International Hospital, Vialedelle Mura Gianicolensi, 67-00100

Gounga, M.E., Xu, S.Y. Wang, Z. & Yang, W.G., 2008, Effect of whey protein isolate-pullulan edible coatings on the quality and shelf life of freshly roasted and freeze-dried Chinese chestnut.food science, 73 (4), E155-161, 2008.

Grosso, N.R., &Resurreccion, A.V.A., 2002, Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science*, 67, 1530-1537.

Javanmard, M., 2008, Shelf Life of Whey Protein-Coated Pistachio Kernel (Pistacia Vera L.). *Journal of Food Process Engineering*, 31(2), 247–259.

Kang, H.J., Kim, S.J., You, Y.S., Lacroix, M. & Han, J., 2013, Inhibitory effect of soy protein coating formulations on walnut (Juglansregia L.) kernels against lipid oxidation. LWT - *Food Science and Technology*, 51(1), 393-396.

Kanner, J., 2007, Dietary advanced lipid oxidation end products are risk factors to human health. *Journal of Molecular Nutrition & Food Research*, 51,1094–1101.

Kita, A. &Figiel, A., 2007, Effect of storage time on texture and selected properties of walnuts.ActaAgrophysica, 2007, 9(1), 69-78

Krochta, J.M., 2002, Proteins as raw materials for films and coating, definition, current status, and opportunities. In, Protein-based Films and Coatings.Gennadios, A (Ed). CRC Press, Boca Raton. USA, Florida.

Lee, S.Y., Trezza, T.A., Guinard, J.X. &Krochta, J.M., 2002, Whey-Protein-Coated Peanuts Assessed by Sensory Evaluation and Static Headspace Gas Chromatography. *Food Science*, 67, 1212-1218.

Leonardis, M., Palange, A., FV Dornelles, R. &Hund, F., 2010, Use of cross-linked carboxymethyl cellulose for soft-tissue augmentation, preliminary clinical studies.*Journal of Clinical Interventions inAging*, 5, 317–322.

Department of Plastic Surgery, Salvator Mundi International Hospital, Roma, Italy;

Liu, Z., Ge, X., Dong, S., Zhao, Y.&Zeng, M., 2012, Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. *Food Hydrocolloids* 26, 311-317

Mate, J.I. &Krochta, J.M., 1997,Whey protein and acetylated monoglyceride edible coatings effect on the rancidity process of walnuts. *Agricultural and food chemistry*, 45 (7), 2509–2513.

Mehyar, G.F., Al-Ismail, KH., Han, J.H., &Chee, G.W., 2012, Characterization of Edible Coatings Consisting of Pea Starch, Whey Protein Isolate, and Carnauba Wax and their Effects on Oil Rancidity and Sensory Properties of Walnuts and Pine Nuts. *Food Science*, E1-E8.

Meilgaard, M., Civille, G.V.& Carr, B.T., 2006, Sensory evaluation techniques. 4th ed. USA, Taylor and Francis Group,CRC Press, USA, Florida.

Mexis, S.F., Badeka, A.V., Riganakos, K.A., Karakostas, K.X. &Kontominas, M.G., 2009, Effect of packaging and storage conditions on quality of shelled walnuts. *Food Control*, 20(8), 743-751.

Min, S. &Krochta J.M., 2007, Ascorbic acid-containing whey protein film coating for control of oxidation. *Agricultural and food chemistry*, 55 (8), 2964-2969.

Natur Land., 2002, organic farming in the tropics and subtropics exemplary description of 20 crops,cashew nuts.1st ed., Natureland, Germany.

Nikzadeh, V. and Sedaghat, N., 2008, Physical and Sensory Changes in Pistachio Nuts as Affected by Roasting Temperature and Storage. American-*Eurasian Journal of Agricalture&Environmet Science*, 4 (4), 478-483.

NurHanani, Z.A., Roos, Y.H. & Kerry, J.P., 2012, Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties, *Food Hydrocolloids*, 29, 144-151.

Oluwaseun, A.C., Kayode, A., Bolajok, F.O., Bunmi, A.J. &Olagbaju, A.R., 2013,Effect of edible coatings of carboxymethyl cellulose and corn starch on cucumber stored at ambient temperature. *Asian Journal of Agriculture&Biological*, 1(3),133-140.

Ozdemir, M., 2001, Mathematical analysis of color change and chemical parameters of roasted hazelnuts.Ph.D Thesis. *Istanbul Technical university*.

Semb, N.T., 2012, Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils.15th ed. NTNU-Trondheim, Norway.

Shahidi, F. &Zhong, Y., 2005, Lipid oxidation, measurement methods, Bailey' s industrial oil and Fat Prodicts, 6 th ed. Vol 6. John's New Foundland, Canada.

Taheri, S., Motalebi, A.A.&Fazlara, A., 2012, Antioxidant effect of ascorbic acid on the quality of Cobia (Rachycentroncanadum) fillets during frozen storage.*Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(3).666-680.

Thakur, N.S., Sharma, S., Joshi, V.K., Thakur, K.S. & Jindal, N., 2012, Studies on drying, packaging and storage of solar tunnel dried chilgoza nuts. Archives of Applied Science Research, 4 (3),1311-1319

Unecef Standard., 2002,Concerning the marketing and commercial quality control of cashew kernels. Ddp-17, United Nations, New York And Geneva.

Zhao, Y. & McDaniel, M., 2005, Sensory quality of foods associated with edible film and coating system and shelf-life extension. In: Han, J.H. (Ed),*Innovations in Food Packaging*. Academic Press. London.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 415-427

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۲۷-۴۱۵

Effect of edible composite coatings on shelf life of roasted pistachio nuts

N. Sedaght[1]*- S. Khoshnoudi-nia[2]

Received: 24.04.2014
Accepted: 15.12.2014

Introduction: Pistachio (*Pistaciavera L.*) is a tasty nut and a good source of nutrients. Ithas a high content of numerous beneficial nutritive and bioactive compounds such as proteins, carbohydrate, moisture, vitamins, minerals, fiber and other micronutrients compounds, but the most exceptional components are the amount of fats and especially unsaturated fatty acids. Therefore, this nut is highly susceptible to rancidity, especially after roasting. Despite the high quality, raw pistachio and pistachio processing industry at Iran, export of roasted and packaged pistachio, due to low shelf life and drastic changes intaste, is not very successfull. An effort was made to investigate the efficacy of gelatin in comparison with carboxymethyl cellulose (CMC) as edible coating to retard fat oxidation in roasted pistachio.

Materials and methods:Five coating formulations were investigated in this study as follow: A) Gelatin (4% w/v) + ascorbic acid (1% w/v): TGA, B) CMC (1% w/v)+ ascorbic acid (1% w/v): "TCA", C) ascorbic acid (1% w/v): "TA", D) Gelatin (4% w/v) + CMC (1% w/v) + ascorbic acid (1% w/v): "TCGA" and 5) control sample (uncoated sample): "TCO".Roasted pistachio nuts were coated by dipping the nuts in the coating solutions. For each treatment, 100 gram of pistachio nuts were packaged (BOPP/Al/CPP, 80 micron plastic bags) in triplicate. The physicochemical analysis included measurement of free fatty acid (FFA), peroxide value (meq.O_2 kg^{-1}),hardness (N), moisture (%) and the sensory evaluation (texture, rancidity, taste and overall acceptability) were performed on coated and uncoated pistachio nuts stored at 35 and 50 °C. The nuts were sampled on the 0th, 1st, 2nd and 3rd month of storage. Data was analyzed using Minitab 16. Analysis of variance (ANOVA) and general linear models (GLM) procedure wereused to compare the mean values of each treatment and Significant differences between the means of parameters were determined based on the results of the Tukey's multiple range test ($p<0.05$).

Results& discussion: The results show that the peroxide value increased with time in coated and uncoated samples. However, this value in gelatin and CMCedible coating containing ascorbic acid was significantly ($p\leq0.05$) lower than the control sample. At 50°C all coatings were less efficient in delaying oxidation. Theminimum peroxide value happened in TCGA sample. Using gelatin and CMC coating containing antioxidants, especially the simultaneous use of both coating materials, in preventing the formation of free fatty acids were more effective than directly addition of antioxidant agents on the pistachio nut surface. In addition, there was a significant difference between control samples and four other formulations.TGA and TCA samples had significantly lower FFA content than other samples, but there was no significant difference between both samples ($p>0.05$).FFA content of TCGA sample was significantly lower than other samples.The highest protection, according to these criterions, was provided by gelatin-CMC coating containing ascorbic acid.The control samples exhibited more bitterness and off flavor than the coated samples, seemingly on account of chemical reaction and second products of oxidation content. Instrumental and sensory hardness of pistachio nuts which were coated with gelatin and/ or CMC (TCA, TGA and TCGA) were significantly ($p<0.05$) higher than control and TA samples. The highest hardness was observed in TCA sample buton the otherhand, uncoated sample (TCO) showed the lowest hardness.The effect of storage time on hardness was also significant ($p<0.05$). Hardness in control samples increased during storage while that of gelatin and or CMC coated pistachio showed decreasing trend.The moisture content of CMC and gelatin coated pistachios were more than control samples. Statistically significant different were recorded for color of coated and uncoated pistachio nuts during 3 months of storage which score of color for control sample was higher than other samples and lowest score corresponding to TA samples. In other words, use of ascorbic acid lonely or in the coating matrix caused reduction of sensory evaluation of color.

Conclusion: The results of this study showed that edible coatings based on gelatin and CMC containing ascorbic acid protect roasted pistachio from oxygen and delay lipid oxidation. Gelatin and CMC coating

1. Associate Professor, Department of Food Science, College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.
2. MSc graduate, Department of Food Science, College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.Address: Department of Food Science and Technology, Shiraz University, Shiraz, Iran.
(*-Corresponding Author Email: sedaghat@yahoo.com)

increased instrumental hardness and sensory firmness of pistachio but provided positive sensory preference compared to the control by protection pistachio nuts against lipid oxidation during the storage. Therefore, use of gelatin-CMC coating containing ascorbic acid as a commodious coating has a good potential for reduction in the rate of oxidation and subsequently increase of shelf life of pistachio nuts and probably other food products containing a high lipid proportion, while gelatin and CMC edible coating did not adversely affect ontotal acceptance of the product.

Keywords: Edible coating, Lipid Oxidation, Pistachio nuts, Roasting, Shelf-life.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 428-437

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۳۷-۴۲۸

مطالعه تأثیر صمغ عربی، پروتئین‌های تغلیظ شده شیر و آب پنیر بر خصوصیات کیفی ماست سین‌بیوتیک حاوی ترانس گلوتامیناز میکروبی

آیدا صالح[۱]، محمود رضازاد باری*[۲]، محمد علیزاده خالد آباد[۳]، نجمه صباحی محمدی[۴]

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۳/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۳۰

چکیده:

در این پژوهش، تأثیر مخلوطصمغ عربی، پروتئین آب پنیر تغلیظ شده (WPC) و پروتئین تغلیظ شده شیر (MPC) بر خصوصیات کیفی ماست سین‌بیوتیک حاوی آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی بررسی شد. مقدار این ترکیبات پروتئینی، مقدار آنزیم، زمان افزودن آنزیم به نمونه‌های ماست و زمان نگهداری نمونه‌ها متغیر بود. به‌منظور بررسی قابلیت زنده‌مانی *بیفیدوباکتر انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس*از محیط کشت افتراقی MRS-LP Agar استفاده گردید. میزان اسیدیته، ظرفیت نگهداری آب، آب‌اندازی و همچنین ویسکوزیته نیز اندازه‌گیری شدند. اثرصمغ عربی، پروتئین آب پنیر تغلیظ شده، پروتئین تغلیظ شده شیر، زمان نگهداری و مقدار آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). سرعت توسعه اسید در نمونه‌هایی که آنزیم بعد از پاستوریزاسیون افزوده شد بیشتر بود. در ابتدای دوره‌ی نگهداری، اثر پروتئین آب پنیر تغلیظ شده بر ظرفیت نگهداری آب بیشتر از سایر فاکتورها بود در حالیکه در پایان دوره‌ی نگهداری پروتئین تغلیظ شده شیر بیشتر از سایر فاکتورها ظرفیت نگهداری آب را افزایش داد. آب‌اندازی به مرورزمان کاهش یافت. بررسی ویسکوزیته نشان داد که پروتئین تغلیظ شده شیر در مقایسه با سایر فاکتورها بیشترین تأثیر را در افزایش ویسکوزیته دارد. نتایج کلی نشان داد که با استفاده از مخلوط صمغ عربی، پروتئین آب پنیر تغلیظ شده، پروتئین تغلیظ شده شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز، می‌توان کیفیت ماست سین‌بیوتیک و قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک حساس *بیفیدوباکتر انیمالیس* زیرگونه‌ی *لاکتیس* را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: ماست سین‌بیوتیک، *بیفیدوباکتریوم انیمالیس*، قابلیت زنده‌مانی، ترانس گلوتامینازمیکروبی

مقدمه

شیر و محصولات لبنی یکی از ۴ گروه عمده‌ی غذاهایی هستند که تعادل را در رژیم غذایی ایجاد می‌کنند. کمیسیون غذایی کدکس در سال ۱۹۹۲ ماست ساده را بعنوان یک فرآورده شیری انعقاد یافته حاصل از تخمیر لاکتیکی شیر توسط دو باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* معرفی کرد (خالصی، ۱۳۸۹). این محصول دارای ترکیبات با ارزش تغذیه‌ای از جمله ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشد. ویتامین‌ها و مواد معدنی موجود در ماست نسبت به شیر زیست دسترسی[۵]بیشتری دارند (Patel, 2011). با افزایش سطح آگاهی مصرف‌کنندگان و توجه بیشتر به رژیم غذایی، غذاهای عملگرا و به بیان دیگر غذاهای فراسودمند جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند. غذای عملگرا[۶] غذاهای شبیه به غذاهای متعارف هستند اما زمانی که جزئی از رژیم غذایی باشند خواص درمانی از خود نشان می‌دهند. فرآورده‌های پروبیوتیک در حال حاضر به‌عنوان شناخته شده‌ترین محصولات غذایی عملگرا بشمار می‌روند. پروبیوتیک یک مکمل میکروبی است که از طریق متعادل‌سازی میکروب‌های بومی روده، اثرات مفیدی بر بدن اعمال می‌کند و امروزه در فرمولاسیون داروها و غذاها، به‌خصوص فراورده‌های تخمیری شیر استفاده می‌شود (Charteris*et al*.,1997). جنس‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر دو نوع معمول پروبیوتیک مورد استفاده در فراورده‌های شیری هستند. از مزایای مهم این باکتری‌ها، کاهش کلسترول سرم، ممانعت از

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیاران، گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.
۴-دانشجوی دکترا، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز.
(* - نویسنده مسئول: Email: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir)

5Bioavailibility
6Functional

سرطان روده، تقویت سیستم ایمنی بدن، و بهبود متابولیسم پروتئین می‌باشد (Christopher*et al*.,2009).

جهت کمک به زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها می‌توان از پری‌بیوتیک‌ها و یا ترکیبات محرک رشد استفاده نمود.پری بیوتیک‌هااجزای غذایی غیرقابل هضم هستند که توسط باکتری‌های خاص مصرف شده و می‌توانند جهت افزایش رشد و بقا باکتری‌ها به آنها افزوده شوند. این ترکیبات عمدتا بصورت منبع قندی و یا منبع نیتروژنی هستند (خسروی دارانی و کوشکی، ۱۳۸۷). صمغ عربی صمغ مترشحه از درخت آکاسیا است و عمدتاً از یک پلی‌ساکارید بسیار منشعب متشکل از واحدهای رامنوز- آرابینوز- گالاکتوز، گلوکورونیک اسید و مقداری کمپلکس پلی‌ساکارید- پروتئین که آرابینوگالاکتان با پیوند کووالان محکم به زنجیر پروتئین متصل شده‌است تشکیل می‌شود (Phillips, Williams&2009). بررسی‌های برخی محققین نشان داده‌است که صمغ عربی یک پری‌بیوتیک می‌باشد و به زنده مانی پروبیوتیک‌ها کمک می‌کند (Calame*etal*.,2008, Desmond *et al*.,2002). ترکیب پروبیوتیک و پری‌بیوتیک سین‌بیوتیک نامیده می‌شود که به واسطه بهبود زنده‌مانی و تکثیر باکتری‌های فلور روده و افزایش رشد یا فعال‌سازی متابولیسم باکتری‌ها، اثرات مفیدی در میزبان ایجاد می‌کند. WPC ضمن اینکه یک ترکیب جایگزین چربی است، محرک رشد پروبیوتیک‌ها نیز به‌شمار می‌رود. میزان پروتئین WPC بین ۸۰-۳۴٪ است (Akalin *et al*., 2007). آب پنیر حاوی میزان نسبتاً بالای پروتئین‌های سرمی، لاکتوز، مواد معدنی و ویتامین‌هاست. به دلیل ارزش بیولوژیکی بالای پروتئین‌های سرمی و همچنین نقش آنها در کاهش تری‌گلیسرید و فشار خون، استفاده از این پروتئین‌ها در رژیم غذایی مورد توجه قرار گرفته‌است. WPC باعث افزایش ظرفیت بافری محصول، کاهش سرعت توسعه اسید و در نتیجه افزایش ماندگاری محصول می‌گردد (Gauche*et al*., 2010). پروتئین تغلیظ شده شیر به دلیل داشتن پروتئین بالا سبب افزایش ماده خشک شیر و تولید ماستی با ویژگی‌های کیفی بهتر خواهد شد. هرچه میزان پروتئین پودر بیشتر باشد میزان لاکتوز آن کمتر است(Şanli*et al*., 2011).

اصلاح پروتئین با آنزیم مزایای زیادی دارد که مهم‌ترین آن‌ها عملکرد اختصاصی آنزیم و نیز امنیت غذایی بالاتر می‌باشد. این روش طی ۱۰ سال اخیر در صنایع مختلف از جمله گوشت، شیلات، لبنیات و غلات به‌کار می‌رود. آنزیم ترانس گلوتامینازیک آسیل ترانسفراز است و منجر به تشکیل اتصالات عرضی می‌گردد (Şanli*et al*., 2011). این آنزیم عمدتاً با جابجایی بین گروه گاما کربوکسامید اسیدآمینه گلوتامیک اسید بعنوان دهنده‌ی آسیل و آمین ابتدایی اسید آمینه لیزین بعنوان گیرنده‌ی آسیل باعث تشکیل پیوندهای درونی و بیرونی پروتئین‌ها می‌شود (Gauche*et al*., 2010). توانایی ایجاد اتصال عرضی توسط این آنزیم به ساختار مولکولی پروتئین بستگی دارد (YÜksel&Erdem, 2010). هدف از این پژوهش مطالعه تأثیر افزودن همزمان یک مخلوط حاوی سه جزء پروتئینی یعنی صمغ عربی، WPC وMPC، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی و همچنین اثر متقابل این اجزا بر خواص کیفی ماست سین‌بیوتیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شیر ۲/۵٪ چربی از شرکت اروم بنیان (سانا) ارومیه، (۳۴٪) WPC و (۶۰٪) MPC از شرکت کیان مشکات و صمغ عربی از شرکت Scharlau اسپانیا تهیه شد. استارتر نوع YC-350و پروبیوتیک *B.animalis*Subsp.*lactis* از نمایندگی شرکت CHR-HANSEN دانمارک خریداری شد. آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (ActivaMP) از شرکت Ajinomoto فرانسه و MRS-Agar از نمایندگی شرکت Merck تهیه گردید.

روش تولید نمونه‌های ماست

ترکیب پروتئینی MPC, WPC و صمغ عربی طبق طرح آزمایشات (جدول ۱)، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به شیر هر تیمار افزوده گردید و تا اختلاط کامل همزده شد. بر مبنای این طرح آماری به تعدادی از نمونه‌ها، آنزیم در مقادیر ۵۰، ۳۰ و ۱۰ واحد/ لیتر شیر افزوده شد و ۱ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در ادامه، نمونه‌ها در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم پاستوریزه شده و سریعاً تا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خنک شدند. استارتر و پروبیوتیک طبق دستورالعمل شرکت سازنده تلقیح شد و شیر هر تیمار به ظروف استریل ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. گرمخانه‌گذاری به مدت ۳/۵ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. طبق طرح آماری آنزیم ترانس گلوتامیناز باید بعد از پاستوریزاسیون به برخی از نمونه‌ها افزوده می‌شد. نمونه‌هایی که قبل از پاستوریزاسیون به آن‌ها آنزیم اضافه نشد در شرایط ذکر شده در بالا پاستوریزه و تا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خنک شدند. سپس استارتر و پروبیوتیک طبق دستورالعمل شرکت سازنده به همراه آنزیم ترانس گلوتامیناز مطابق با طرح آزمایشات به نمونه‌ها افزوده گردید. گرمخانه‌گذاری نیز مطابق شرایط مذکور انجام شد. کلیه‌ی نمونه‌های ماست در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در روزهای ۱، ۱۱ و ۲۱ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱- طرح آزمایشات

Run	Block	A	B	C	D	E	F
		%	%	%	واحد/ لیتر شیر[1]	روز	
۱	بلوک ۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۱	قبل پاستور
۲	بلوک ۱	۱/۵	۰	۰	۵۰	۱	قبل پاستور
۳	بلوک ۱	۰	۱/۵	۰	۱۰	۱	بعد پاستور
۴	بلوک ۱	۰	۱/۵	۰	۵۰	۲۱	بعد پاستور
۵	بلوک ۱	۰	۰	۱/۵	۵۰	۲۱	بعد پاستور
۶	بلوک ۱	۱/۵	۰	۰	۱۰	۲۱	بعد پاستور
۷	بلوک ۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۱	قبل پاستور
۸	بلوک ۱	۰	۰	۱/۵	۱۰	۱	قبل پاستور
۹	بلوک ۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۱	بعد پاستور
۱۰	بلوک ۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۱	بعد پاستور
۱۱	بلوک ۲	۰	۰	۱/۵	۵۰	۲۱	قبل پاستور
۱۲	بلوک ۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۱	قبل پاستور
۱۳	بلوک ۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۱	قبل پاستور
۱۴	بلوک ۲	۱/۵	۰	۰	۵۰	۲۱	قبل پاستور
۱۵	بلوک ۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۱	بعد پاستور
۱۶	بلوک ۲	۰/۷۵	۰	۰/۷۵	۱۰	۱	بعد پاستور
۱۷	بلوک ۳	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۰	۱۱	بعد پاستور
۱۸	بلوک ۳	۰/۷۵	۰	۰/۷۵	۱۰	۲۱	قبل پاستور
۱۹	بلوک ۳	۰	۰	۱/۵	۵۰	۱	بعد پاستور
۲۰	بلوک ۳	۱/۵	۰	۰	۵۰	۱	بعد پاستور
۲۱	بلوک ۳	۱/۵	۰	۰	۱۰	۱	قبل پاستور
۲۲	بلوک ۳	۰	۱/۵	۰	۵۰	۱	قبل پاستور
۲۳	بلوک ۳	۰	۰	۱/۵	۱۰	۲۱	بعد پاستور
۲۴	بلوک ۳	۰	۱/۵	۰	۱۰	۲۱	قبل پاستور

A: پروتئین آب پنیر تغلیظ شده، B: پروتئین تغلیظ شده شیر، C: صمغ عربی، D: مقدار آنزیم، E: زمان نگهداری، F: زمان افزودن آنزیم

شمارش پروبیوتیک

بمنظور شمارش پروبیوتیک BB-12 از محیط کشت MRS-LP Agar[1] استفاده شد. محیط کشت بااستفاده از ۰/۲٪ لیتیم کلراید و ۰/۳٪ سدیم پروپیونات افتراقی گردید که توسط فیلتر سر سرنگی به MRS-Agar استریل افزوده شد (Van de Casteele *et al.*, 2006Vinderola*et al.*, 2000). برای کشت میکروبی نمونه‌ها، ۱ میلی‌لیتر از نمونه به پپتون واتر استریل ۰/۱٪ افزوده و تا رقت ۸ بصورت سریالی رقیق شدند. در ادامه ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های موردنظر به پلیت‌ها منتقل شده و بصورت پورپلیت کشت داده شد (Akin&GülerAkin&Ramchandran, 2009, 2007).

اسیدیته

مطابق روش تیتراسیون با استفاده از سدیم هیدروکسید (۰/۱N) و معرف فنل فتالئین اندازه‌گیری و تعیین شد (استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲).

۱- محیط کشت MRS-Agar حاوی ۰/۲٪ لیتیم کلراید و ۰/۳٪ سدیم پروپیونات

اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری آب

حدود ۵ گرم نمونه (Y) به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰rpm سانتریفوژ شده و سرم جداشده وزن گردید (W) (Ramchandran, Sahan *et al.*, 2008&2009). ظرفیت نگهداری آب از رابطه زیر بدست آمد(Sodini *etal.*, 2004):

$$WHC = (Y-W) / Y *10 \qquad (۱)$$

اندازه‌گیری مقدار آب اندازی[2]

حدود ۴۰-۳۰ گرم نمونه با دور ۲۲۲ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (Model UNIVERSAL 320 R; Hettich, Tuttlingen, Germany) شد (kennedy, Keogh&1998) و مقدار این پارامتر بصورت درصد نسبت وزنی سرم جدا شده محاسبه گردید (Matomoto*et al.*, 2010).

اندازه‌گیری ویسکوزیته ظاهری

ویسکوزیته ظاهری با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد (LVDV-II

2 Syneresis

+ Pro, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, USA)، اسپیندل شماره ۶۴ و سرعت برشی ۳۰rpm اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها قبل از اندازه‌گیری ویسکوزیته ۶۰ ثانیه به آرامی بهم زده شدند و اندازه‌گیری‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Tamime&Robinson, 1998, Katsiariet al. 2002).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

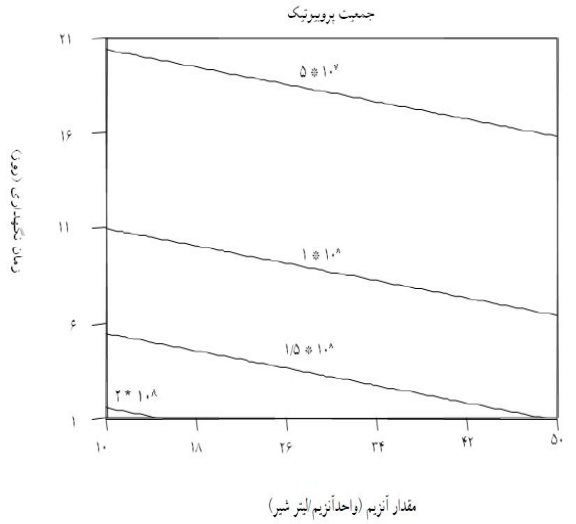
در این مطالعه از طرح ترکیبی D-optimal استفاده گردید که در آن فاکتورهای فرآوری (مقدار آنزیم، زمان افزودن آنزیم و زمان نگهداری) بصورت همزمان با فاکتورهای فرمولاسیون (مخلوط صمغ عربی، MPC، WPC) مورد مطالعه قرار گرفت. بمنظور ارزیابی داده‌ها و بدست آوردن مدل‌های پیشگویی‌کننده سطح اطمینان α =۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ استفاده شد.

نتایج و بحث

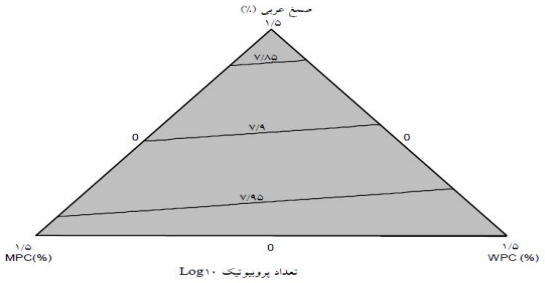
قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک

تأثیر افزودن صمغ عربی، WPC، MPC، مقدار آنزیم و زمان افزودن آنزیم بر قابلیت زنده‌مانی BB-12، طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. زمان نگهداری و مقدار آنزیم ترانس گلوتامیناز بطور معنی‌داری بر زنده‌مانی پروبیوتیک موثر بود($P< 0.05$). همانگونه که در شکل ۱ قابل مشاهده است جمعیت پروبیوتیک‌ها به مرور زمان در نمونه‌ها کاهش یافت که احتمالاً به دلیل رابطه‌ی آنتاگونیستیک بین باکتری‌های سنتی ماست و پروبیوتیک‌ها، افزایش اسیدیته و هیدروژن پراکسید می‌باشد (Akin&Rezazad *et al*., 2009,Güler, 2007 ,Akin).اگرچه جمعیت پروبیوتیک به مرور زمان کاهش یافت اما این تعداد تا آخرین روز نگهداری نمونه‌ها، همچنان از حد ذکر شده در استاندارد (10^{6}–10^{7}cfu/g) بالاتر بود. شکل ۲ نشان می‌دهد که صمغ عربی بر افزایش قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک مؤثر بوده‌است اما اثر WPC وMPC بیشتر از آن بود. با توجه به شکل ۳ زمانی که تنها از MPC استفاده شود، با حداقل مقدار آنزیم (۱۰واحد/ لیتر شیر) می‌توان به بالاترین مقدار زنده‌مانی دست یافت. زمانی که از مخلوط MPC و صمغ عربی استفاده شد هر چه میزان MPC افزایش یافت، قابلیت زنده‌مانی بیشتر شد. همچنین می‌توان چنین نتیجه گرفت که در نسبت ثابتی از این دو جزء با مقادیر کم آنزیم ، قابلیت زنده‌مانی بالا بود. بطور کلی زمانی که نسبت MPC به WPC بالاتربود، با تغییر آنزیم در محدوده‌ی ۱۷–۱۰واحد آنزیم/ لیتر شیر، قابلیت زنده‌مانی مطلوب‌تری مشاهده‌شد. همچنین مشاهده‌شد که هر چه نسبت WPCبه MPC افزایش یافت مقدار آنزیم بیشتری برای رسیدن به زنده‌مانی مطلوب لازم خواهد بود. Doherty و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تأثیر پروتئین‌های آب پنیر بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها، اثر WPC را بر افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک و استارتر تأیید نموده‌اند (Doherty *et. al*., 2011). بر اساس تحقیقاتNadal و همکاران (۲۰۱۰) افزودن پروتئین‌های آب پنیر می‌تواند ظرفیت بافری را بهبود بخشیده و از تأثیر محیط اسیدی بر زنده‌مانی باکتری‌ها بکاهند.

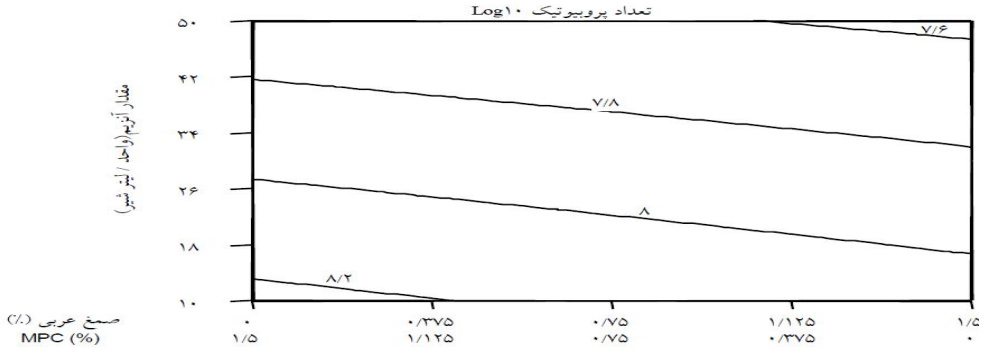
WPC منبع خوبی برای تأمین پپتیدها و آمینواسیدهای لازم برای رشد پروبیوتیک‌ها است. این ترکیب غنی از اسیدهای آمینه گوگرددار است که طی حرارت‌دهی آزاد شده و پتانسیل اکسیداسیون احیا را کاهش می‌دهند و در نتیجه عامل محرک رشد پروبیوتیک محسوب می‌گردد. Akalin و همکاران (۲۰۰۷) با پژوهشی که در زمینه تأثیر فروکتوالیگوساکاریدها و آب پنیر تغلیظ شده بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتر انیمالیس* داشتند، گزارش کردند که WPC نسبت به اینولین نقش موثرتری در افزایش زنده‌مانی بیفیدیوباکترها داشته‌است. همچنین طبق نتایج این پژوهش، تصور می‌شود که MPC نیز به دلیل داشتن میزان بالای پروتئین باعث تولید پپتیدها و آمینواسیدهای بیشتری در محیط شده و همین امر منجر به افزایش رشد و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها شده است. در نسبت ثابتی از مخلوط پروتئینی با افزایش میزان آنزیم در قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها بهبودی حاصل نشد. این پدیده ممکن است به‌علت افزایش بیش از اندازه اتصالات عرضی ایجاد شده توسط آنزیم باشد. یافته‌های Bonisch و همکاران (۲۰۰۷) در مطابقت کامل با نتایج این پژوهش می‌باشد. این درحالی است که Benkovic و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که آنزیم اثر منفی بر رشد باکتری‌های استارتر و تولید ریزمغذی‌های لازم برای رشد پروبیوتیک‌ها ندارد.



شکل ۱- اثر زمان نگهداری و مقدار آنزیم بر زنده‌مانی پروبیوتیک



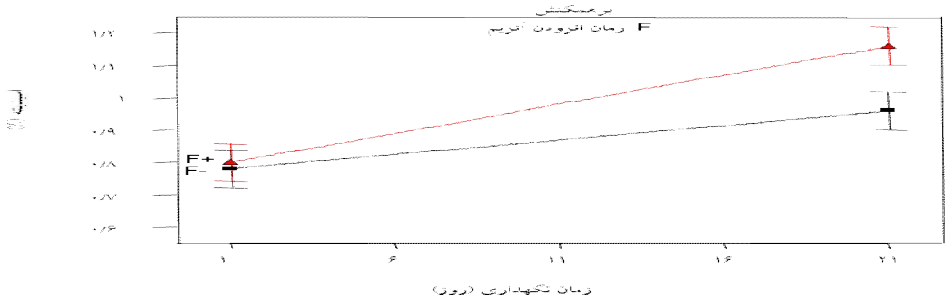
شکل ۲- اثر ترکیبات پروتئینی بر جمعیت پروبیوتیک



شکل ۳- اثر ترکیب صمغ عربی، MPC و مقدار ترانس گلوتامیناز بر زنده‌مانی پروبیوتیک

اسیدیته

آنالیز داده‌ها نشان داد که اثر زمان نگهداری و زمان افزودن آنزیم بر اسیدیته نمونه‌های ماست معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). اثر متقابل زمان افزودن آنزیم و زمان نگهداری در شکل ۴ نشان داده شده است. در روزهای ابتدایی نگهداری، زمان افزودن آنزیم تأثیر معنی‌داری بر اسیدیته نداشت اما با گذشت زمان اسیدیته نمونه‌ها افزایش یافت. Akin و Güler Akin (۲۰۰۷) به نتایج مشابهی دست یافتند. طی نگهداری به دلیل ادامه فعالیت لاکتوباسیلوس‌ها در دمای یخچال و تولید مقدار اندک اسیدلاکتیک، pH همچنان کاهش می‌یابد (Kailasapathy, 2006). نتایج تحقیقات Marafon و همکاران (۲۰۱۱) بر ماست‌های پروبیوتیک غنی شده با پروتئین‌های شیر نشان داد که این اجزا بر اسیدیته و قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های استارتر بسیار مؤثر است. Seelee و همکاران (۲۰۰۹) با مقایسه اسیدیته ماست‌های پروبیوتیک کم چرب حاوی WPC و نمونه‌های شاهد گزارش کردند که تا روز ۲۱ نگهداری، نمونه‌های حاوی WPC اسیدیته بالاتری از نمونه‌های شاهد داشتند. سرعت توسعه اسید در نمونه‌های ماستی که آنزیم ترانس گلوتامیناز بعد از پاستوریزاسیون افزوده شده‌بود نسبت به نمونه‌هایی که آنزیم قبل از پاستوریزاسیون اضافه‌شد، افزایش بیشتری نشان داد. این رخداد ممکن است به دلیل اتصال عرضی ایجادشده توسط آنزیم باشد. Yuksel (۲۰۱۰) پژوهشی که در زمینه‌ی تأثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر ویژگی‌های ماست قالبی انجام داد نتایج مشابهی را گزارش نمود.

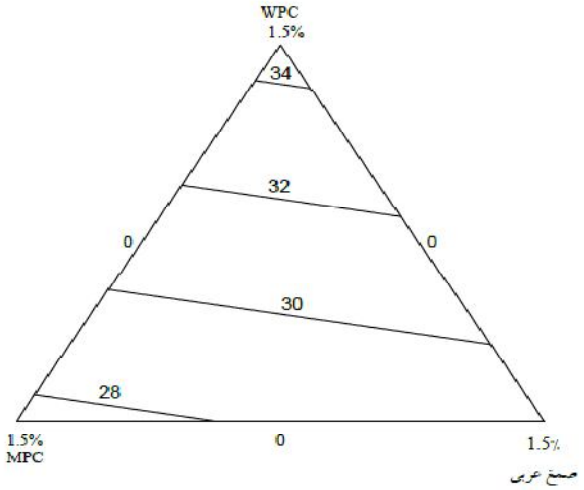


F^+:بعد از پاستوریزاسیون F^-: قبل از پاستوریزاسیون

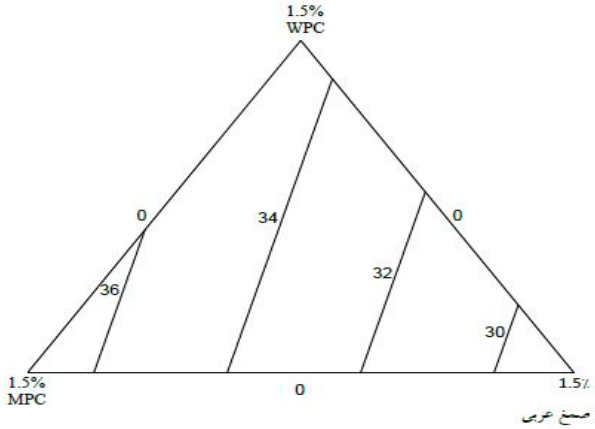
شکل ٤- اثر متقابل زمان افزودن آنزیم و زمان نگهداری بر اسیدیته

ظرفیت نگهداری آب[1]

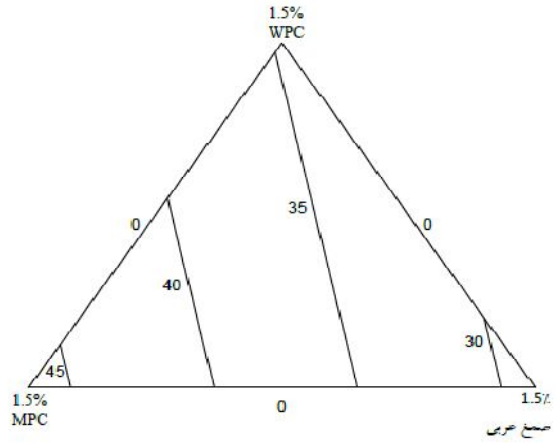
عوامل متعددی بـر ظرفیـت نگهـداری آب مؤثرنـد کـه از جملـه مهم‌ترین آنها اسیدیته، مقدار پروتئین، دمای نگهداری و میزان چربـی می‌باشد. افزایش میزان پروتئین باعث افزایش پیوندهای آبی می‌گردد. اثرزمـان نگهـداری و مخلـوط ۳ جزئـی بـر WHC معنـی‌دار بـود (P<۰/۰۵). همانگونه که در شکل های ۵، ۶ و ۷ مشاهده می‌شود، در روزهای اولیه نگهداری، WPC بالاترین تأثیر را بر این پارامتر داشـت در حالیکه در روزهای انتهایی نگهداری MPC مؤثرترین فاکتور بـود. این مسئله احتمالاً به دلیـل بـرهمکنش پـروتئین آب پنیـر و کـازئین می‌باشد که در نهایت منجر به افزایش ظرفیت نگهداری آب در شبکه می‌گردد. کازئین شـیر قـادر بـه اتصـال ۲/۸۲ گـرم آب در هـر گـرم پروتئین است. همچنین در مورد پروتئین‌های آب پنیر دناتوره شـده و غیر دناتوره این مقدار به ترتیـب ۲/۳۴ و ۰/۳۲گـرم آب در هـر گـرم پروتئین می‌باشد (Ünal *et al.*, 2003). بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که اصلاح پروتئین‌های شیر (بـه‌خصـوص کـازئین و آب پنیـر دنـاتوره شـده) منجـر بـه افـزایش ظرفیـت نگهـداری آب خواهـد شد.همچنینبا افزایش زمان نگهـداری، ظرفیـت نگهـداری آب بهبـود یافت. در محلول‌های پروتئینی به علت ژل ایجاد شده توسط آنـزیم و ایجـاد شـبکه‌ی پایـدارتر ظرفیـت نگهـداری آب افـزایش مـی‌یابـد (Patel, 2011&Lorenzen *et al.*, 2002).



شکل ۵- کانتورپلات اثر صمغ عربی، WPC و MPC بر ظرفیت نگهداری آب در روز ۱ ام نگهداری



شکل ٦- کانتورپلات اثر صمغ عربی، WPC و MPC بر ظرفیت نگهداری آب در روز ۱۱ ام نگهداری



شکل ۷- کانتورپلات اثر صمغ عربی، WPC و MPC بر ظرفیت نگهداری آب در روز ۲۱ام نگهداری

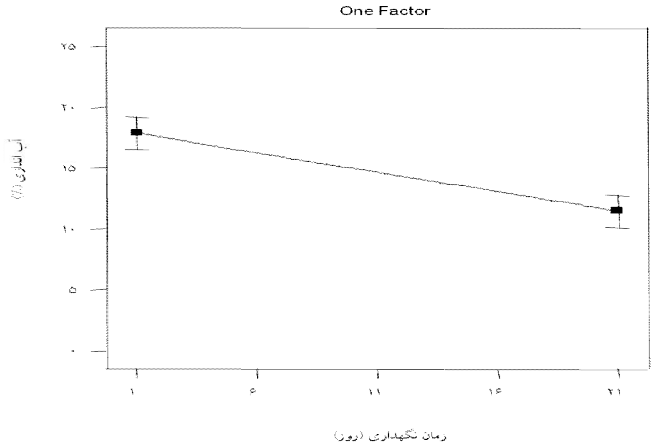
آب‌اندازی

آب‌اندازی در ژل[2]، جدا شدن فاز آبی از فاز پیوسته می‌باشد و یکی از فاکتورهای مهـم در تعیـین کیفیـت ماسـت بشـمار مـی‌رود. زمـان نگهداری بر مقدار این پارامتر مؤثر بود (P<۰/۰۵). بـا افـزایش زمـان نگهداری آب‌اندازی بطور قابل توجهی کاهش یافت (شـکل ۸). علـت این امر می‌تواند مربوط به ارتباط اسیدیته و آب‌اندازی باشد. Latorre و همکاران (۲۰۰۳) طبق تحقیقات خود بر رئولوژی ماست‌های قـالبی تهیه شده با انواع پروبیوتیـک و اسـتارتر و همچنـین Saad&Souza (۲۰۰۹) بیان کردند که با افزایش غلظت یون‌های هیدروژن، نیروهای دافعه کاهش یافته و در میسل‌هـای کـازئینی تجمـع رخ مـی‌دهـد. از طرفی احتمـالاً بـا فعالیـت آنـزیم و ایجـاد اتصـالات عرضـی شـبکه پروتئینی مسـتحکم‌تـر شـده و میـزان سـینرزیس کـاهش مـی‌یابـد.

1Water holding capacity (WHC)

2 Wheyoff

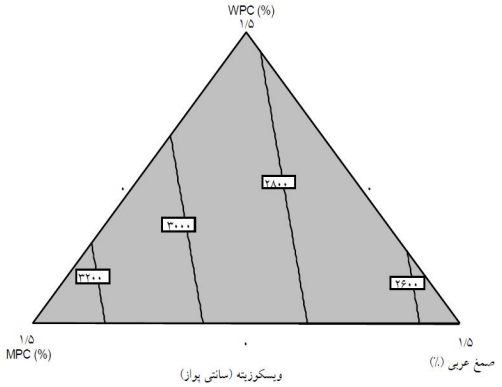
Domagala و همکاران (۲۰۱۳) با مطالعه ماست قالبی تهیه شده با مقادیر مختلف آنزیم ترانس گلوتامیناز نتایج مشابهی را گزارش نمودند. همچنین Matumoto و همکاران (۲۰۱۱) با پژوهشی که در زمینه‌ی ماست حاوی پروتئین‌های آب پنیر داشتند به این نتیجه رسیدند که ترکیبات پروتئین آب‌پنیر بر کاهش سینرزیس و ایجاد یک ساختار همگن بسیار اثرگذار می‌باشد.



شکل ۸- تغییرات سینرزیس به مرور زمان

ویسکوزیته

ویسکوزیته ظاهری شاخص پایداری پروتئین می‌باشد. مقدار پایدارکننده مورد نیاز برای رسیدن به یک کیفیت مطلوب، رابطه‌ی عکس با غلظت ماده خشک دارد (Katsiari *et al*., 2002). تأثیر ترکیب صمغ عربی، WPC و MPC بر ویسکوزیته در شکل ۹ نشان داده شده است.ویسکوزیته نمونه‌های غنی شده با WPC، MPC و صمغ عربی به دلیل تفاوت در میزان پروتئین و همچنین منشأ پروتئین افزوده شده متفاوت می باشد.طبق شکل ۹ با افزایش نسبت MPC در مخلوط ۳ جزئی ویسکوزیته افزایش بیشتری داشت.ویسکوزیته نمونه‌های دارای MPC، بالاتر از سایر نمونه‌ها بود.



شکل ۹- تأثیر مخلوط ۳ جزئی بر ویسکوزیته

این امر احتمالاً به دلیل بالا بودن میزان پروتئین MPC بوده - است که نهایتاً منجر به ایجاد شبکه ژلی مستحکم‌تر و در واقع ویسکوزیته بیشتر شد. در بررسی مشابه که Marafon و همکاران (۲۰۱۱) بر ویژگی‌های رئولوژیکی ماست پروبیوتیک غنی شده با MPC انجام شد به وضوح قابل مشاهده‌است که ماست‌های تهیه شده با MPC ویسکوزیته‌ی بیشتری دارند. همچنین Sodini و همکاران (۲۰۰۴) با مطالعه‌ای بر تاثیر اجزا افزوده شده به شیر بر بافت ماست به نتایج مشابهی دست یافتند.

نتیجه‌گیری

بطور کلی نتایج نشان داد که با استفاده از مخلوط ۳ جزئی MPC، WPCو صمغ عربی به همراه حداقل مقدار آنزیم ترانس گلوتامیناز می‌توان قابلیت زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک BB-12 را به میزان قابل توجهی بهبود بخشید. همچنین استفاده از این ترکیب به مرور زمان منجر به کاهش آب‌اندازی و افزایش ظرفیت نگهداری آبمی‌گردد.

در این تحقیق برای اولین بار تأثیر همزمان سطوح مختلف آنزیم و همچنین زمان‌های مختلف افزودن آنزیم بر ویژگی‌های کیفی ماست سین‌بیوتیک بررسی شد و فرمولاسیون مناسبی جهت کاهش استفاده از پودرهای مذکور و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بدست آمد

منابع:

استاندارد ماست- آزمون اندازه‌گیری اسیدیته‌ی کل قابل عیارسنجی به شماره‌ی ۲۸۵۲. (۱۳۷۴). کرج: موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی.

استاندارد ملی ماست: ویژگی‌ها و روش‌های آزمون به شماره‌ی ۶۹۵. (۱۳۷۱). کرج: موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی.

خالصی، ه: ۱۳۸۹، «بررسی ویژگی‌های صمغ زدو و تأثیر افزودن ترکیبی صمغ زدو، صمغ تراگاکانت و صمغ عربی در تولید ماست کم چرب»، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

خسروی دارانی، ک؛ کوشکی، م. ر: ۱۳۸۷، پروبیوتیک‌ها در شیر و فرآورده‌های آن. انتشارات مرز دانش، تهران، ۱۸۶-۷۷.

Akalin, A.S., Gönç, S., ÜNAL, G., Fenderya, S, 2007, Effects of Fructooligosacharide and WheyProtein Concentrate on the Viability of Starter Culture in Reduced-Fat Probiotic Yogurt during Storage,*Journal of Food Science*, 72(7), 222-227.

Benkovic, m., Kos, B., Tonkovic, K., Lebos, A., Śuśkovic, J and Gregurek, L.j,2008,. Lactis LAFTI B94, Inulina transglutaminazenasvojstvacvrstogjogurta. *Mljekarstvo*, 58, 95-115.

Bönisch, M., Huss, M., Lauber, S.,Kulozik, U, 2007, Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation,*Food Hydrocolloid*, 21, 585-595.

Calame, W., Weseler, A.R., Viebke, C.h., Flynn, C., and Siemensma, A.D, 2008, Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner,*British Journal of Nutrition*, 100, 1269–1275.

Charteris, W.P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, K, 1997,Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacteriumspieces in mixed bacterial populations,*International Journal of Food Microbiology*, 35, 1-27.

Christopher, M.D., Padmanabhareddy, V., Venkateswarlu, K, 2009, Viability during storage of two bifidobacteriumbifidum strains in set and stirred flavored yoghurts containing whey protein concentrate, *Natural Product Radiance*, 8(1), 25-31.

Dave, R.I., Shah, N.P, 1998, Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt, *Journal of Dairy Science*, 81, 2804-2816.

Desmond, C., Ross, R.P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G and Stanton, S, 2002, Improved survival of Lactobacillus paracasei NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia, *Journal of Applied Microbiology*,93, 1003–1011.

Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F and A. Brodkorb, 2010, Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of Lactobacillus rhamnosus GG, *Journal of Microbiological Methods*, 80(3), 231-241.

Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F and A. Brodkorb, 2011, Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection, *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1604-1617.

Doherty, S.B., Auty, M.A., Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F and A. Brodkorb, 2012, Survival of entrapped Lactobacillus rhamnosus GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit, *International Dairy Journal*, 22(1), 31-43.

Domagałaa, J.,Wszołeka,M.,Tamimeb, A.Y., Kupiec-Teahan,B,2013, The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresisand microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period, *Small Ruminant Research*,112, 154– 161.

Gauche, C., Barreto, P.L.M., Bordignon-Luiz, M.T, 2010, Effect of thermal treatment on whey protein polymerization by transglutaminase, Implications for functionality in processed dairy foods, *Food Science and Technology*, 43, 214-219.

Güler-Akin, M.B., Akin, M.S, 2007, Effect of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat milk, *Food Chemistry*, 100, 788-793.

Kailasapathy, K, 2006,Survial of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt, *Food Science of Technology*, 39, 1221-1227.

Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Kondyli, E, 2002, Manufacture of yogurt from stored frozen sheep's milk, *Food Chemistry*, 77, 413-420.

Keogh, M.K., Ó kennedy, B.T, 1998, Rheology of stirred Yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids,*Journal of Food Science*, 63, 108-112.

Latorre, L., Tamime, A.Y., Muir, D.D, 2003, Rheology and sensory profiling of set type fermented milks made with different commercial probiotic and yogurt starter cultures,*International Journal of Dairy Technology*, 56, 1-9.

Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A and Schlimme, E,2002, Effect of enzymatic cross-linking of milk protein on functional properties of set yoghurt,*International Journal of Dairy Technology*, 55, 152157.

Marafon, A.P., Sumi, A., Alcantara, M.R., Tamime, A.Y., Oliveria, M.N.D, 2011,Opimization of the rheological properties of probiotic yogurt supplemented with milk proteins,*Food Science and Technology*, 44, 511-519.

Matomoto-Pintro, P.T., Rabiey, L., Robitaille, G., Britten, M, 2010, Use of modified whey protein in yoghurt formulations, *International dairy Journal*, 21,21-26.

Nadal, E.S., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J and Pérez-Alvarez, J.A, 2010, Food formulation to increase probiotic bacteria action or population. Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics, 335-351.

Özer, B., Kırmacı, H.A., Öztekin, S., Hayalo_glu, A., &Atamer, M,2007, Incorporation of microbial transglutaminase

into non-fat yogurt production, *International Dairy Journal*, 17(2), 199-207.

Patel,S, 2011,Evaluating the Effect of Milk Protein Concentrates (MPC) Fortification on Rheological Properties of Non-fat Set Yoghurt Using Vane Rheometry. Dissertation, Wisconsin-Stout University, M.C. *Faculty of Food and Nutritional Sciences*.

Ramchandran, L, 2009,Physico-chemical and therapeutic properties of low-fat yogurt as influenced by fat replacers, exopolysacharids and probiotis, Doctor of philosophy dissertation, *Victoria University* (Australia).

Rezazad, B. M., Ashrafi, R., Alizadeh, M., Rofehgarineghad, L, 2009,Effect of different content of yogurt starter/probiotic bacteria, storage time and different concentrations of cystein on the microflora characteristics of bio-yogurt,*Research Journal of Biological Science*, 4, 137-142.

Sahan, N., Yasar, K., Hayaloglu, A.A,2008, Physical, chemical and flavor quality of non-fat yogurt as affected by a β-glucanhydrocolloidal composite during storage, *Food Hydrocolloid*, 22, 1291-1297.

Şanli, T., Sezgin, E., Deveci, O., Şenel, E., Benli, M, 2011, Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt,*Food Hydrocolloid*, , 1-5.

Seelee, W., Tungjaroenchai, W., and Natvaratat, M, 2009, Development of low fat set-type probiotic yoghurt from goat milk,*Asian Journal of Food Agriculture Industry*, 2(04), 771-779.

Shah, N.P, 2000,Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy food, *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907.

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, SandCorrieu, G, 2004, The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture, *Critical Reviews in Food Scienceand Nutrition*, 44, 113-137.

Souza, C.H.B, Saad, S.M.I, 2009, Viability of lactobacillus acidophilus La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt stater culture and implications on physic-chemical and related properties on minas fresh cheese during storage,*Food Science and Technology*, 42, 633-640.

Tamime. A.V and Robinson, R.K, 1999,Yoghurt science and technology 2nded,Boca Ratan. CRC press,NY, 587.

Ünal, B., Metin, S., Işikli, N.D, 2003, Use of response surface methodology to describe the combined effect of storage time, locust bean gum and dry matter of milk on the physical properties of low-fat set yoghurt,*International Dairy Journal*, 13, 909-916.

Van de Casteele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruyssen, T., Van Assche, P., Swings, J and Huys, G, 2006, Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yogurt or cheese starters,*International Dairy Journal*,16, 1470–1476.

Vinderola, C.G., Bailo, N and Reinheimer, J.A,2000, Survival of probiotic microflora in Argentinian yogurts during refrigerated storage,*Food Research International*, 33, 97–102.

Williams, P.A., Phillips, G.O, 2009, Gum Arabic. In: G. O. Philips & P. A. Williams editors, Handbook of hydrocolloids, 2 nd ed. *CRC Press*, 252-273.

YÜksel, Z and Erdem, Y.K, 2010,The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt,*International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 86-97.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 428-437

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۳۷-۴۲۸

Studying on the effect of Arabic gum, Milk protein concentrate and Whey protein concentrate on the quality indices of synbiotic yoghurt supplemented with transglutaminase

A. Saleh[1], M. Rezazad Bari[2]*, M. Alizadeh Khaled Abad[3], N. Sabahi Mohammadi[4]

Received: 2014.06.20
Accepted: 2015.06.20

Introduction: Yoghurt is one of the most popular dairy products in all over the world.Nowadays due to the tendency of consumers to use the products with healthy effects, probiotic and synbiotic products are considered. Yoghurt by itself is a healthy food; because of its high levels of protein and calciumcontents.Consumption ofprobiotic bacteria via food products is a way to reestablishthe intestinal microflora balance. Several studies have been done to improve the growth and viability of probiotic bacteria by adding supplements to milk.The objective of this study was to investigate the effect of three component mixture (Arabic gum, whey protein concentrate and milk protein concentrate) on quality indices of synbiotic yoghurt containing transglutaminaseenzyme. The content of theseprotein component, the amount of enzyme, enzyme addition time to the yoghurt samples and storage time were variable

Materials and methods:Yoghurt samples were prepared with milk which contained 2.5 percent fat.Milk was heated around 40℃. WPC, MPC and Arabic gum were added to samples according to the research design and increasing the solid none-fat content of the milk up to 1.5%. Samples were pasteurized at 90℃ for 10 minutes in a water bath and were cooled rapidly to 43℃ for inoculation starter culture and probiotic bacteria. Also enzyme was added to samples before or after pasteurization (according to the research design).In this study microbial test was done to investigateviability of probiotics (BB-12) by differential culture medium (MRS-LP Agar). The titratable acidity was determined using 0.1 N NaOH until accessing the constant pink colour for 30secondes. Water holding capacity (WHC) was determined due to measure the protein quality of keeping water inside. Syneresis is expressed as the weight percentage of serum released by centrifugation. Viscosity was measured using a Brookfield viscometer.Viscosity measurementswere made using 250 mL ofyoghurt samples at 10 _C

Discussion & Results: The effect of WPC, MPC, Arabic gum, enzyme concentration and theaddition time of enzyme on viability of *B. lactis (BB-12)* for 21 days of cold storage at 4℃ were monitored. The results indicatedthat the effect of Arabic gum, WPC and MPC on viability of probiotic was significant ($p<0.05$). The effect of storage time and addition time of transglutaminase were significant on titratable acidity (TA) of samples ($\alpha< 0.05$). By mixingenzyme after pasteurization, acidity developed more rapidly.Storage time and protein mixture had significant effect on WHC ($\alpha\leq 0.05$). Linearly stage of storage time effect of WPC was higher than other components while at the end of storage period MPC increased WHC more than other factors. As time goes on syneresis was decreased and MPC was more effective than other constitutes in the reduction of Synersis of the samples. MPC was more effective than other factors on improving viscosity too.By using 3 components mixture (Arabic gum, WPC and MPC) and transglutaminasecould improve quality of synbiotic yoghurt and viability of probiotics.

Keywords: Synbiotic Yoghurt, Bifidobacterium Animalis, Viability, Microbial Transglutaminase

1-Msc of Food Technology, Department Of Food Science And Technology, Faculty Of Agriculture, Urmia University, Urmia. Iran.
2, 3- Associate professor, Department of food science and technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
4- Ph. D Candidate of Food Microbiolog, Department of food science and technology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, iran.
(*-Corresponding Author Email: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir)

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 438-452

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۵۲-۴۳۸

بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی فلور لاکتیکی جدا شده از مراحل تولید کره مسکه علیه باکتری‌های شاخص مواد غذایی

محمد رضا عدالتیان دوم[1*]، مسعود یاورمنش[2]، فریبا قیامتی یزدی[3]، مرتضی خمیری[4]، ندا نیری[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۱۴

چکیده

فعالیت بازدارندگی ۵۱ جدایه باکتری اسیدلاکتیک بدست آمده از شیر گوسفند، ماست گوسفندی و کره محلی مسکه در مقابل میکروارگانیسم‌های شاخص بیماری‌زا شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *لیستریا اینوکوا*و غیر بیماری‌زا از جمله: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس ساکی*، *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس* مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت. از میان ۵۱ ایزوله باکتری اسید لاکتیک، ۴۴ ایزوله در روش نقطه‌گذاری در برابر حداقل یکی از باکتری‌های شاخص، خاصیت بازدارندگی از خود نشان دادند. در حالیکه در روش نفوذ در چاهک، این تعداد به ۳۹ ایزوله کاهش یافت. در این مرحله، ۸ ایزوله که شامل گونه‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (۱ ایزوله)، *انتروکوکوس فاسیوم* (۱ ایزوله)، *انتروکوکوس دورانس* (۱ ایزوله) و *آئروکوکوس ویریدنس* (۵ ایزوله) بودند بیشترین اثر آنتاگونیستی را بر باکتری شاخص *لیستریا اینوکووا* نشان دادند. از این بین، فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت یک ایزوله *آئروکوکوس ویریدانس* دارای بالاترین مقاومت حرارتی بود. همچنین دو ایزوله *آئروکوکوس ویریدانس*، فعالیت ضدمیکروبی خود را در pHخنثی حفظ کرده بودند. فقط فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت دو ایزوله شامل *انتروکوکوس فاسیوم* و *آئروکوکوس ویریدنس*، تحت تاثیر آنزیم پروتیئناز K قرار نگرفت. تمام این خصوصیات فیزیکوشیمیایی جالب، اجازه می‌دهد که عصاره فاقد سلول (سوپرناتانت) برخی از ایزوله‌های مذکور، بعنوان نگهدارنده بیولوژیکی در مواد غذایی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، خواص بازدارندگی، باکتریوسین، روش نقطه‌گذاری،روش نفوذ در چاهک

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که ویژگی‌های مورفولوژیکی، متابولیکی و فیزیولوژیکی خاص خود را دارند (Savijoki *et al*., 2006). علاوه بر آن، باکتری‌های اسیدلاکتیک، یک منبع با ارزش از عوامل ضد میکروبی، از جمله باکتریوسین‌ها بشمار می‌آیند (Cotter, *et al*., 2005). باکتریوسین‌ها، پپتیدهای غیرسمی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که دارای فعالیت ضدمیکروبی بوده و به اسید و گرما مقاوم و به سهولت هضم می‌شوند. باکتریوسین می‌تواند ابزاری برای بهبود امنیت و کیفیت غذاهای تخمیر شده باشد.

باکتریوسین بصورت یک ماده افزودنی در غذاها می‌تواند از رشد باکتری‌های بیماری‌زا و اسپورهای آن‌ها جلوگیری کند. در کشورهای صنعتی، این روش‌ها در مقایسه با کاربرد باکتریوسی‌ها یا سایر محافظت‌کننده‌ها، به میزان کمتری مورد استفاده قرار گرفته است و ممکن است بعنوان روشی جایگزین برای بهبود محافظت از غذاها در محیط بکار گرفته شود و منجر به کاهش مسمومیت در غذاهای تخمیری شود (Chen, 2003؛ Guinane, 2005؛ Nandakumar,1999 ؛ Olasapo, 1999).

باکتریوسین‌ها بر اساس خواص بیوشیمیایی و ویژگی‌های ژنتیکی به ۳ گروه اصلی طبقه بندی می‌شود:

گروه اول: لنتی بیوتیک‌ها[2] : پپتیدهای کوچک و مقاوم به گرما هستند و در ساختمان خود اسیدهای آمینه لانتیونین[3]ومتیل

۱، ۲ و ۵- استادیاران و دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشجوی دکتری گرایش میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان
۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(* - نویسنده مسئول:Email:edalatian@um.ac.ir)

2 Lantibiotics
3 Lanthionin

لانتیونین[1] دارند. لنتی‌بیوتیک به دو زیر گروه تقسیم می‌شوند. زیر گروه اول که دارای ساختمان کشیده و انعطاف پذیر بوده و دارای بار مثبت است که با ایجاد منفذ در ساختمان غشاء در گونه‌های هدف، باعث افزایش نفوذپذیری آنها می‌شود. باکتریوسین نایسین[2] عضوی از این گروه است که توسط *Lactococcuslactissubsp. lactis* تولید می‌شود. نایسین در ابتدا بصورت پری‌نایسین تولید می‌شود که دارای ۵۷ اسیدآمینه است. سپس تغییراتی در اسیدآمینه‌های آن بوجود آمده که به پرونایسین تبدیل می‌شود و در نهایت با خروج ۲۳ اسید آمینه به نایسین فعال با ۳۴ اسیدآمینه مبدل می‌شود. زیر گروه دوم، پپتیدهای کروی و دارای ساختمان سفت و محکم و دارای بار منفی یا خنثی هستند. آن‌ها در واکنش‌های آنزیمی ضروری و حساس باکتری‌ها مداخله می‌کنند (Riley& Chavan, 2007).

گروه دوم: باکتریوسین‌های با وزن‌های مولکولی متغیر اما معمولا کوچک، مقاوم به گرما و دارای اسیدآمینه‌های منظم هستند. این گروه به ۳ زیر گروه تقسیم می‌شود. زیر گروه اول شامل پپتیدهای فعال در مقابل لیستریا[3] است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان پدیوسین پی آ–۱[4] و ساکاسین پی[5] را نام برد. زیر گروه دوم شامل دو پپتید مکمل می‌باشد که شامل لاکتوکوکسین جی[6]، پلانتاریسین جی کی[7] و پلانتاریسین ای اف[8] است. زیر گروه سوم شامل پپتیدهای کوچک و مقاوم به حرارت است که بوسیله پپتید رهبر انتقال پیدا می‌کنند. باکتریوسین‌های دایورجیسین آ[9] واسیدوسین بی[10] در این گروه قرار دارند (Riley& Chavan, 2007).

گروه سوم: پپتیدهای بزرگ با وزن مولکولی بالای ۳۰ کیلودالتون هستند. در این گروه باکتریوسین‌های هلوتیسینجی[11]، هلوتیسین وی[12]، اسیدوفیلیسین آ[13]، لاکتاسین آ[14] و لاکتاسین بی[15] جای می‌گیرند (Riley& Chavan, 2007).

در فراورده‌های لبنی محلی مانند پنیر و کره‌ی محلی، که فلور میکروبی آن بطور طبیعی ایجاد می‌شود، باکتری‌های ایزوله شده، عموما متعلق به جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *پدیوکوکوس*، *استرپتوکوکوس*و *انتروکوکوس* می‌باشند. باکتری‌های اسیدلاکتیک در بین فلور میکروبی کره بسیار حائز اهمیت بوده و در واقع میکروارگانسیم‌های ذاتی و طبیعی کره‌های محلی بوده‌اند. هریک از جنس‌های این خانواده می‌توانند تاثیر خاصی بر روی ویژگی‌های کره داشته باشند (Idoul, &Karam, 2008).

کره مسکه، به محصولی اطلاق می‌شود که از چربی ماست، پس از انجام عملیات تلمبزنی گرفته می‌شود. شیر گوسفند یا گاو تحت فرایند حرارتی ملایم و فرایندهای تخمیری به ماست تبدیل می‌شود سپس ماست بدست آمده را درون ماست‌زن‌های دستی یا تلمب‌های پوستی ریخته و پس از طی زمان تلمب زنی، ماست دو فاز شده و فاز کره‌ای روی سطح قرار گرفته جدا می‌شود. تحقیقات زیادی بر روی محصولات محلی انجام پذیرفته و باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت سنتی و مدرن (مولکولی) مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته‌اند. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۱)، با استفاده از نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن16S rRNA ریبوزومی به بررسی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در پنیر لیقوان پرداختند. آن‌ها توانستند جنس‌های *انتروکوکوس*، *لاکتوکوکوس* و *لاکتوباسیلوس* را در پنیر لیقوان (از مرحله شیر تا تولید پنیررسیده) شناسایی کنند. Rodriguez و Gonzalez (۲۰۰۶) بر روی تنوع باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیک اسید ایزوله شده از شیر خام، تحقیق نمودند. باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده باکتریوسین، از ۲۸۹ نمونه شیر گوسفند، گاو و بز، ایزوله شدند. ۸۲ باکتری تولیدکننده باکتریوسین، از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی، شناسایی شدند.

عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲)، مطالعه‌ای بر روی خواص باکتریوسین‌های باکتری‌های انتروکوکوس (انتروسین) ایزوله شده از پنیرهای سنتی ایرانی (لیقوان و کوزه) انجام دادند. در این بررسی مشخص شد از تعداد ۹۶ ایزوله انتروکوکوس، تعداد ۴۸ ایزوله، اثر بازدارندگی را بر روی حداقل یک باکتری شاخص در روش نقطه‌گذاری[16] نشان دادند. که از این تعداد، ۲۰ ایزوله مطابق با ۱۵ سویه مختلف، در محیط کشت مایع در روش نفوذ در چاهک[17]، مشخص شد که ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید می‌کنند.

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مختلفی بر ترکیبات باکتریوسینی تولید شده توسط فلور لاکتیکی موجود در این محصول، موثر می‌باشند. از جمله‌ی این فاکتورهای فیزیکوشیمیایی می‌توان به اثر درجه حرارت و سطوح pH مختلف و آنزیم پروتئیناز K بر مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی شبه باکتریوسینی اشاره نمود. بر این اساس khay و همکاران (۲۰۱۱) بر روی فعالیت‌های ضدمیکروبی ترکیبات

1Methyllanthionine
2Nisin
3Listeria
4Pediocin PA-1
5Sakacin P
6Lactococcin G
7Plantaricins JK
8Plantaricins EF
9Divergicin A
10Acidocin B
11Helveticins J
12Helveticins V
13Acidofilicin A
14Lactacins A
15Lactacins B

16Agar Spot
15Agar Well Diffusion Assay

شبه باکتریوسینی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر پژوهش نمودند و در این پژوهش، حساسیت این ترکیبات با قرار دادن سوپرناتانت فاقد سلولی در معرض سه حرارت، پنج pH و شش آنزیم مختلف از جمله تریپسین و پاپایین سنجیده شد.همچنین Cardoso و همکاران (۲۰۱۲) بر روی ترکیبات شبه باکتریوسینی *Enterococcus faecalis* در برابر باکتری‌های گرم منفی، کپک‌ها و مخمرها پژوهش نموده و تاثیر سه فاکتور درجه حرارت، pH و آنزیم‌های مختلف را بر این ترکیبات بررسی نمودند.

هدف اصلی از انجام این تحقیق، پس از جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از شیر گوسفند، ماست و کره محلی مسکه حاصل از آن، بررسی تاثیر ترکیبات ضدمیکروبی شبه باکتریوسینی توسط فلور لاکتیکی بر روی باکتری‌های شاخص بیماری‌زا شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و لیستریا اینوکوا* توسط روش‌های مبتنی بر کشت (نقطه‌گذاری و نفوذ در چاهک) و سپس بررسی اثر برخی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مانند درجه حرارت‌های مختلف، سطوح pH مختلف و اثر آنزیم پروتئیناز K بر روی مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی شبه باکتریوسینی بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه های لبنی

سه نمونه شیر، سه نمونه ماست و سه نمونه کره محلی مسکه حاصله از آن‌ها، از تولیدکنندگان محلی در مناطق مختلف گناباد (در جنوب خراسان رضوی) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها مخصوصاً از مناطقی که بطور سنتی، سال‌های زیادی است که به تولید کره محلی مسکه مشغول هستند، جمع‌آوری گردید همه نمونه‌ها از شیر گوسفند تهیه شده و مربوط به شهرستان‌های ریاب (جنوب غربی گناباد)، بیمرغ (شرق گناباد)، برجوک (جنوب شرقی گناباد) و بند ازبک (شرق گناباد) بود. نمونه‌ها از بچ‌های مختلف که در ماه‌های مختلف سال (بهمن تا خرداد) تولید شده‌اند، جمع‌آوری شده و در کیسه‌های استریل در ۴°C به آزمایشگاه انتقال یافت و کلیه آزمون‌های مربوطه ظرف ۲۴ ساعت آینده انجام پذیرفت.

میکروارگانیسم‌های شاخص و شرایط کشت

همانطور که در جدول ۱، مشاهده می‌شود، جهت بدست آوردن کشت فعال از میکروارگانیسم‌های شاخص، پس از کشت بر روی محیط مناسب، به مدت ۲۴ ساعت (به استثناء *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* به مدت ۷۲ ساعت)، در دمای مربوطه گرمخانه‌گذاری شد.

جدول ۱- میکروارگانیسم‌های شاخص و شرایط کشت

شماره	میکروارگانیسم شاخص	شرایط رشد
۱	*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)	Tripticase Soy Agar (TSA)-37°C-liofilchem-Italy
۲	*Listeria innocoa* (ATCC33090)	Tripticase Soy Agar (TSA)-37°C
۳	*E.coli* (ATCC 25922)	Tripticase Soy Agar (TSA)-30°C
۴	*Lactobacillus sakei* (ATCC15521)	DeMan Rogosaand Sharpe (MRS - Merk- Germany)-37°C
۵	*Lactobacillus plantarum* (ATCC8014)	DeMan Rogosaand Sharpe (MRS)-37°C
۶	*Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* (ATCC 11454)	M17+1% lactose-Fluka- USA-30°C
۷	*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*(ATCC 19275)	M17+1% lactose-30°C

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک

نمونه‌های شیر و ماست (۱۰ میلی‌لیتر) در ۹۰ میلی‌لیتر محلول NaCl ۰/۸۵ وزنی- حجمی (Merk, Germany) هموژنیزه شده و پس از آن رقیق‌سازی سریالی در محلول نمکی ذکر شده انجام پذیرفت. برای نمونه‌های مسکه، ۲۵ گرم کره محلی در ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول تری سدیم فسفات ۲٪ وزنی- حجمی (pH=۷/۵) (Merk, Germany) همگن شده و تا ۴۰°C بتدریج گرم شد و سپس رقیق‌سازی سریالی توسط آب پپتونه ۱٪ (Merk, Germany) انجام شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول‌های رقیق‌سازی شده، در دو تکرار بر روی محیط‌های کشت مناسب کشت سطحی داده شد و جداسازی باکتریایی انجام شد (Van Hoorde, ؛Schleifer, 1985-1987 2008). بمنظور تایید گونه‌های جداسازی شده، با استفاده از روش‌های مولکولی شامل استخراج DNA، انجام PCR با برنامه دمایی بصورت ذیل:

فعال‌سازی: دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، یک سیکل

واسرشته‌سازی: دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه(دناتوراسیون)

اتصال پرایمر:دمای ۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه

توسعه: دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۳ سیکل

توسعه نهایی: دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، یک سیکل.

برای مشاهده نتایج واکنش PCR پس از بارگذاری واکنش‌های PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪، الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت و زمان ۳۵ دقیقه انجام شد و با پرایمرهای یونیورسال از ناحیه ژن rRNA 16S

پرایمر پیش‌رو: (5´-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG -3´) 27FYM وپرایمر معکوس: (5´-GTTACGACTT -3´ GGTTACCTT) 1492R و توالی‌یابی محصولات حاصل از تکثیر، ایزوله‌ها تا مرحله گونه و زیرگونه با دقت بیشتر شناسایی شدند (Alegría, *et al*., 2009).

پایش فعالیت‌های ضدمیکروبی

تکنیک نقطه‌گذاری

فعالیت آنتاگونیستی تمامی ایزوله‌ها در محیط کشت جامد با توجه به روش اصلاح شده Fleming و همکاران (۱۹۸۵) صورت پذیرفت. بطور خلاصه، میزان ۵ میکرولیتر از کشت یک شبه ایزوله‌ها بر روی سطح پلیت‌های حاوی BHI agar اصلاح شده (BHI به همراه ۰/۲ درصد گلوکز) نقطه‌گذاری گردید و سپس در دمای ۳۲ °C به مدت ۲۴ ساعت، جهت رشد و توسعه نقطه‌ها ، گرمخانه‌گذاری شد. سپس، نقاط مزبور با ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آگار نرم (۰/۷۵درصد) مطابق با هر باکتری شاخص تلقیح شده به میزان ۰/۲۵ درصد با باکتری شاخص، پوشیده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی مورد نیاز هر باکتری شاخص گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، پلیت‌ها جهت هاله شفاف حاصل از بازدارندگی در اطراف نقاط بررسی و کنترل گردیدند.

تکنیک نفوذ در چاهک

سویه‌های مثبت، در آزمون نقطه‌گذاری، جهت فعالیت ضدمیکروبی در یک آزمون نفوذ در چاهک، مورد بررسی قرار گرفتند. بطور خلاصه، کشت‌های یک شبه از باکتری‌های شاخص جهت تلقیح (به میزان ۱٪) به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آگار مربوطه در دمای ۴۵°C استفاده شدند. سپس، محیط کشت‌های تلقیح شده داخل پلیت‌ها ریخته شد و بعد از جامد شدن، تعداد ۶ تا ۷ چاهک در هر پلیت ایجاد گردید. بعد از آن، ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت خنثی شده (pH= ۶/۵ -۷) و استریل شده با فیلتر غشایی (0.2 µm pore membrane; Millipore, Bedford, MA, USA) حاصل از سویه‌های مولد ترکیبات ضدمیکروبی رشد کرده در BHI در داخل این چاهک‌ها ریخته شد. تمامی پلیت‌ها در شرایط دمایی مناسب گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از آن ایجاد هاله حاصل از ممانعت در اطراف چاهک‌ها بررسی گردید (عدالتیان و همکاران، ۲۰۱۲).

بررسی طبیعت ترکیبات ضدمیکروبی

تاثیر آنزیم پروتئیناز K بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

بمنظور بررسی حساسیت آنزیمی ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، سوپرناتانت فاقد سلول توسط آنزیم پروتئیناز k (Sigma Aldrich, USA)، در غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر مورد تیمار قرار گرفت. مخلوط واکنش آنزیم-سوپرناتانت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. فعالیت بازدارندگی باقی مانده توسط تکنیک نفوذ در چاهک مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کنترلی (محیط کشت استریل و آنزیم در غلظت ذکر شده) آماده شدند. همچنین سوپرناتانت تیمار نشده (Untreated CFS) ایزوله‌ها نیز برای مقایسه اندازه قطر هاله بازدارندگی، در کنار سوپرناتانت‌های تیمار شده با آنزیم پروتئیناز K ، قرار گرفتند (Cardoso, *et al*., 2012).

تاثیر دماهای مختلف بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

حساسیت ترکیبات شبه باکتریوسینی به حرارت توسط قرار دادن سوپرناتانت فاقد سلول هر جدایه در حرارت‌های ۳۰ °C به مدت ۹۰ دقیقه، ۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰°C به مدت ۱۵ دقیقه و بالاخره توسط اتوکلاو (۱۲۱°C) به مدت ۱۵ دقیقه سنجیده شد. پس از آن، فعالیت‌های ضدمیکروبی توسط روش AWDA مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کنترل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند (Cardoso, *et al*., 2012).

تاثیر سطوح مختلف pH بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

بمنظور بررسی مقاومت ترکیبات شبه باکتریوسینی در برابر سطوح مختلف pH، عصاره فاقد سلول در pHهای ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ توسط HCl و NaOH نرمال، تنظیم شد و اثرات بازدارندگی آن توسط تکنیک AWDA مورد ارزیابی قرار گرفت (Lou, *et al*., 2011؛ Cardoso, *et al*., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح آماری بکار رفته، طرح کاملاً تصادفی باآزمون فاکتوریل بود. بطوریکه متغیرها عبارت بودند از : pH در ۵ سطح (۳، ۵، ۷ و ۱۱)؛ در جه حرارت در ۴ سطح (حرارت‌های ۳۰°C به مدت ۹۰ دقیقه، ۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰°C به مدت ۱۵ دقیقه و بالاخره توسط اتوکلاو (۱۲۱°C) به مدت ۱۵ دقیقه) و اثر آنزیم پروتیناز K در یک سطح (در غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر). تمامی آزمایش‌ها در دو تکرار انجام شد.میانگین و انحراف معیار با کمک نرم افزار Excel محاسبه گردید.آنالیز داده‌ها با نرم افزار Minitab 16 و مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار MSTATC با آزمون LSD صورت گرفت و سطح معنی‌داری داده‌ها ۵٪ =α بود.

نتایج و بحث

پس از انجام مراحل توالییابی از میان ۵۱ ایزوله جدا شده از مراحل مختلف تولید کره مسکه، جنس و گونه‌های ذیل به ترتیب

فراوانی شناسایی شدند: *Ent. hirae*، *Ent. durans*، *Ent. faecium* و *Ent. Lactis* (۱۶)، *اثروکوکوس (ویریدنس و یورینه ایکو)* (۱۳)، *Streptococcus thermophilus* (۱۱)، *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (۷)، *Leuconostoc mesenteroides*. (۳)، *Lac. Lactis* (۱). نتایج جدول ۲، نشان می‌دهد از میان ۵۱ ایزوله، ۴۴ ایزوله بر حداقل یکی از باکتری‌های شاخص (اعم از باکتری‌های شاخص بیماری‌زا و یا غیر بیماری‌زا) موثر بوده است. بطور دقیق‌تر، مشخص گردید که باکتری *E. coli* توسط ۳۳ ایزوله، باکتری *Staph. Aureus* توسط ۷ ایزوله، *Listeria. innocoa* توسط ۱۱ ایزوله، *Lb. plantarum* توسط ۱۲ ایزوله، *Lb. sake* توسط ۷ ایزوله، *Lac. Lactis* ssp.*lactis* توسط ۳۵ ایزوله و در نهایت *Lac. lactis*ssp. *cremoris* توسط ۷ ایزوله ممانعت گردیدند. همانطور که ملاحظه می‌شود و از نتایج بر می‌آید در بین باکتری‌های شاخص بیماری‌زا، باکتری *E.coli*، بیشتر از بقیه تحت تاثیر واقع شدند و در بین باکتری‌های شاخص غیربیماری‌زا یا همان باکتری‌های شاخص اسید لاکتیک، *Lac. lactis* ssp.*lactis* توسط بیشتر ایزوله‌ها ممانعت شدند.

جدول۲- قطر هاله بازدارندگی حاصل از آزمون Agar Spot

شماره	×کد باکتری	نام باکتری	باکتری‌های شاخص						
			E. coli	*Staph. aureus*	*Listeria. innocoa*	*Lb. plantarum*	*Lb. sake*	*Lac. lactis ssp.lactis*	*Lac. lactis ssp. cremoris*
۱	B170	*Str.thermophilus*	+*	-	+	+	−	+	-
۲	B164	*Ent. faecium*	+	+	-	+	-	+	-
۳	M55	*Leu.mesenteroides*	+	-	-	-	-	-	-
۴	M263	*Ent.lactis*	+	-	-	-	-	+	-
۵	Y11	*Ent. durans*	+	-	+	+	-	+	-
۶	M23	*Leu.mesenteroides*	-	-	-	-	-	+	-
۷	M268	*Leu.mesenteroides*	-	-	+	-	-	+	-
۸	M234	*Ent. hirae*	+	-	-	-	-	+	+
۹	M8	*Lac. lactis*	-	−/+	-	−	−	+	−
۱۰	M235	*Ent. faecium*	+	−	−	−	−	+	−
۱۱	B161	*Ent. faecium*	-	-	++++	−	+	+	+
۱۲	M254	*Ent. faecium*	+	-	+	−	−	+	−
۱۳	M142	*Ent. durans*	-	-	-	−	−	+	−
۱۴	M245	*Ent. durans*	+	-	+	−	−	+	−
۱۵	M182	*Ent. faecium*	+	−	+	−	−	+	−
۱۶	Y4	*Ent. faecium*	−	−	−	−	−	+	−
۱۷	B258	*Str.thermophilus*	+	-	+++++	−	−	−	−
۱۸	M220	*Ent. faecium*	+	−	−	−	−	+	−
۱۹	M14	*Ent. faecium*	+	−	−	+	+	+	−
۲۰	Y106	*Str.thermophilus*	+	+	-	−	−	−	−
۲۱	M256	*Ent. durans*	+	+	-	−	−	+	−
۲۲	B66	*Lb. fermentum*	+	+	-	−	−	+	−
۲۳	Y109	*Str.thermophilus*	+	-	-	−	−	−	−
۲۴	M143	*Aerococcus viridians*	−	−	−	−	−	+	−
۲۵	M24	*Ent. hirae*	+	−	−	+	+	+	−
۲۶	B227	*Aerococcus viridians*	+	-	-	−	−	−	−
۲۷	M165	*Aerococcus viridians*	+	+	-	−	−	+	−
۲۸	M171	*Aerococcus viridians*	+	−	−	−	−	+	−

۲۹	M141	*Aerococcus viridians*	−	−	−	−	−	+	−
۳۰	M156	*Aerococcus viridians*	+	-	-	−	−	+	−
۳۱	M237	*Ent. faecium*	+	-	-	−	−	−/+	+
۳۲	M238	*Ent. faecium*	+	-	-	−	−	+	+
۳۳	M11	*Ent. faecium*	+	-	-	+	−	+	+
۳۴	M256	*Ent. faecium*	+	−	−	−	−	+	+
۳۵	B120	*Lb. plantarum*	+	+	+	++	++	−	++
۳۶	M101	*Aerococcus viridians*	-	-	+	−	−	−	−
۳۷	M109	*Aerococcus urineke*	-	-	+	−	−	−	−
۳۸	B23	*Lb. fermentum*	-	-	-	+	+	+	−
۳۹	B35	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+	-	-	+	+	+	−
۴۰	B37	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+	-	-	−	+	+	−
۴۱	B38	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+	-	-	+	−	+	−
۴۲	B39	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+	-	-	−	−	−	−
۴۳	Y19	*Str.thermophilus*	+	-	-	+	−	+	−
۴۴	Y75	*Str.thermophilus*	+	-	-	+	−	+	−

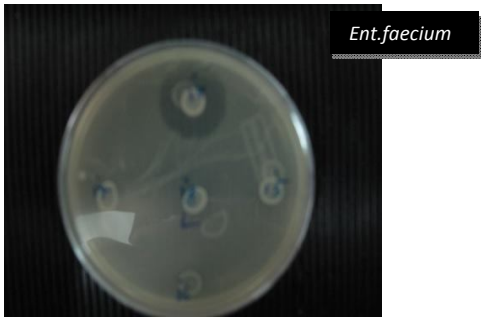
* تعداد علامت‌های مثبت، بیانگر قطر هاله بزرگتر و در نتیجه مبین قدرت بازدارندگی بیشتر ایزوله می‌باشد. علامت منفی، مشخص‌کننده عدم تولید هاله شفاف می‌باشد.

× کد باکتری ، مخفف مراحل تولید کره مسکه است. M(Milk) مرحله شیر، B (Butter) مرحله تولید کره و Y (Yoghurt) مرحله تولید ماست.

کدهای B260 (*Str.thermophilus*) ، B272 (*Str.thermophilus*)، B259(*Str.thermophilus*) ، B251 (*Str.thermophilus*) ،، M181 (*Aerococcusviridians*)، M112(*Aerococcusviridians*) ، Y73 (*Str.thermophilus*).

بر روی هیچ یک از باکتری‌های شاخص تاثیر ضد میکروبی نداشتند بنابراین در جدول آورده نشدند.

اما از میان ایزوله‌های اسید لاکتیک، دو ایزوله *Ent. Faecium* کد B161 و *Str.thermophilus* کد B258 بیشترین اثر بازدارندگی یا قطر هاله حاصل از بازدارندگی را روی باکتری شاخص *Listeria. Innocoa* نشان دادند. شکل ۱، هاله شفاف حاصل از بازدارندگی ایزوله *Ent. faecium* بر روی باکتری *Listeria. Innocoa* را نشان می‌دهد. نکته جالب و قابل توجه اینکه، هر دو سویه مورد نظر از کره مسکه ، ایزوله شده بودند، که نشان‌دهنده این حقیقت است که منشاء اولیه هر دو سویه احتمالاً یکی بوده است.



شکل۱- هاله شفاف حاصل از بازدارندگی سویه *Ent. Faecium* بر روی باکتری شاخص *Listeria. innocoa*.

دلیل تشکیل هاله شفاف در روش نقطه‌گذاری، را می‌توان علاوه بر باکتریوسین یا ترکیبات شبه باکتریوسین ، بحضور ترکیبات ضدمیکروبی وابسته به کلونی[1] از قبیل وجود پراکسید هیدروژن ، اسید لاکتیک یا سایر اسیدهای ارگانیک نسبت داد (Alegría, *et al*., 2009). در تحقیق دیگر توسط عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲) که بر روی انتروکوکوس‌های ایزوله شده از پنیرهای سنتی ایران صورت گرفته بود، مشاهده کرد که در روش نقطه‌گذاری، از بین ۹۶ ایزوله، ۴۸ ایزوله انتروکوکوس روی حداقل یکی از باکتری‌های شاخص اثر بازدارندگی داشته است. این امر نشان‌دهنده قدرت و پتانسیل بالای باکتری‌های جنس انتروکوکوس، در ممانعت‌کنندگی باکتری‌های شاخص می‌باشد. همینطور بصورت مشابه ملاحظه گردید، که بیشترین قطر هاله بازدارندگی ایزوله‌ها بر روی شاخص *Listeria. Innocoa* می‌باشد که با نتایج حاصله از این تحقیق نیز مطابقت و هماهنگی دارد. در این راستا، محققان زیادی اثر ضدلیستریایی باکتری‌های اسید لاکتیک بویژه جنس انتروکوکوس را نشان داده بودند.یکی از قابل توجه‌ترین خصوصیات بسیاری از باکتریوسین‌های انتروکوکال فعالیت بازدارندگی بسیار ویژه و خیلی قوی آنها در برابر

1 Colony associated antimicrobial compounds

لیستریا می باشد (Parente & Hill, 1992). کنترل گونه‌های جنس لیستریا، یک دغدغه جدی در ایمنی مواد غذایی است چرا که این پاتوژن می‌تواند در اکثر مواد غذایی وجود داشته باشد(Muriana, 1996). نکته قابل تامل دیگری که از جدول ۲ قابل دریافت است، وجود باکتری *Lb.plantarum* کدB120 است، که روی ۶ باکتری شاخص از ۷ باکتری شاخص، اثر بازدارندگی داشته است. این باکتری از مرحله کره مسکه ایزوله شده است و فقط روی باکتری شاخص *Lac. lactis* ssp.*lactis* تاثیری نداشته است. از آنجا که ایجاد هاله شفاف بازدارندگی ممکن است به دلایل دیگری غیر از تولید ترکیبات شبه باکتریوسین باشد از قبیل پراکسید هیدروژن و یا اسیدهای ارگانیک مانند اسید لاکتیک، بنابراین نمی‌توان بطور قطع بر اساس نتایج حاصل از آزمون نقطه‌گذاری قضاوت نهایی را انجام داد، لذا تمام ایزوله‌های مورد بررسی (۵۱ ایزوله) اعم از ایزوله‌هایی که در روش نقطه‌گذاری مثبت بودند و آن ایزوله‌هایی که منفی بودند، در قالب آزمون نفوذ در چاهک، مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون سوپرناتانت یا عصاره فاقد سلول باکتری‌ها FreeSupernatant Cell (CFS) از نظر قدرت ممانعت‌کنندگی یا تولید هاله شفاف بر روی باکتری‌های شاخص مورد بررسی قرار گرفتند. جدول ۳، نتایج حاصل از آزمون نفوذ در چاهک را برای ۵۱ ایزوله باکتری اسید لاکتیک و بر روی ۷ باکتری شاخص (بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا) نشان می‌دهد.

جدول۳- قطر هاله بازدارندگی حاصل از آزمون نفوذ در چاهک

شماره	*کد باکتری	نام باکتری	باکتری های شاخص						
			E. coli	*Staph. aureus*	*Listeria. innocoa*	*Lb. plantarum*	*Lb. sake*	*Lac. lactis ssp.lactis*	*Lac.lactis ssp. cremoris*
۱	B170	*Str.thermophilus*	−	−	++	+	−	−	−
۲	B164	*Ent. faecium*	−	−	++	+	−	−	−
۳	M263	*Ent.lactis*	+weak	−	−	++	−	−	−
۴	Y11	*Ent. durans*	−	−	++	+	−	−	−
۵	M234	*Ent. hirae*	−	−	−	−	−	−	+
۶	B260	*Str. thermophilus*	+ weak	−	−	+	−	+	−
۷	M8	*Lac. lactis*	+ weak	−	−	+	−	+	−
۸	M235	*Ent. faecium*	−	−	−	+	−	−	−
۹	B161	*Ent. faecium*	−	−	−	−	−	−	+
۱۰	M254	*Ent. faecium*	−	−	−	weak +	-	-	+
۱۱	M142	*Ent. durans*	+ weak	−	−	weak +	+	-	-
۱۲	M182	*Ent. faecium*	−	−	−	weak +	+	-	+
۱۳	Y4	*Ent. faecium*	−	+	−	weak +	-	+	-
۱۴	B251	*Str.thermophilus*	−	−	−	-	-	-	+
۱۵	M220	*Ent. faecium*	+ weak	−	−	-	+	+	+
۱۶	M14	*Ent. faecium*	+ weak	−	−	+	+	-	+
۱۷	Y106	*Str.thermophilus*	−	−	−	-	-	+	+
۱۸	M256	*Ent. durans*	+ weak	−	−	+	+	-	+
۱۹	Y109	*Str.thermophilus*	−	−	−	-	-	+	+
۲۰	M24	*Ent. hirae*	+ weak	−	−	-	-	-	+(?)*
۲۱	B227	*Aerococcus viridians*	−	−	++	+	+	+	-
۲۲	M181	*Aerococcus viridians*	−	−	−	+	-	+	-
۲۳	M165	*Aerococcus viridians*	−	+	++	-	+	+	-
۲۴	M171	*Aerococcus viridians*	−	−	++	+	+	-	-
۲۵	M141	*Aerococcus viridians*	−	−	++	+	+	-	-
۲۶	M156	*Aerococcus viridians*	−	−	+++	+	+	+	+
۲۷	M237	*Ent. faecium*	+ weak	−	−	+	+	-	-
۲۸	M238	*Ent. faecium*	−	−	−	+	-	-	-
۲۹	M11	*Ent. faecium*	−	−	−	-	+	-	-

۳۰	M256	*Ent. faecium*	−	−	−	-	+	-	-
۳۱	M112	*Aerococcus viridians*	−	−	−	+	+	-	-
۳۲	B120	*Lb. plantarum*	−	−	−	-	+	-	-
۳۳	M101	*Aerococcus viridians*	−	−	−	+	-	-	-
۳۴	M109	*Aerococcus urineke*	−	−	−	+	+	-	-
۳۵	Y73	*Str.thermophilus*	−	−	−	+	+	-	-
۳۶	B23	*Lb. fermentum*	−	−	−	+	-	-	-
۳۷	B35	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	−	−	−	+?	+	-	+
۳۸	B37	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+ weak	−	−	+?	-	-	-
۳۹	Y75	*Str.thermophilus*	+ weak	−	−	-	-	-	-

(؟) مشکوک،weak :در این موارد قطر هاله تشکیل شده، ضعیف و بسیار کم بود.

تعدادعلامت‌هایمثبت،بیانگرقطرهالهبزرگترودرنتیجهمبینقدرتبازدارندگییبیشترایزولهمی‌باشد. علامتمنفی،مشخص‌کنندهعدمتولیدهالهشفافمی‌باشد.

* کد باکتری ، مخفف مراحل تولید کره مسکه است. M(Milk)مرحله شیر،B (Butter) مرحله تولید کره و Y (Yoghurt) مرحله تولید ماست.

کدهایM55 (*Leu.mesenteroides*)، M23 (*Leu.mesenteroides*) ، M268 (*Leu.mesenteroides*)، B272 (*Str.thermophilus*)، B259M245(*Str.thermophilus* (*Ent. durans*)، B258 (*Str.thermophilus*)، B66 (*Lb. fermentum*)، M143 (*Aerococcus viridians*)، B38 (*Lb. delbrueckii spp. lactis*)، B39 (*Lb. delbrueckii spp. lactis*)، Y19 (*Str.thermophilus*) بر هیچ یک از باکتری‌های شاخص تاثیر ضدمیکروبی نشان دادند بنابر این در جدول فوق آورده نشده است.

در این روش ۳۹ ایزوله باکتری اسید لاکتیک بر حداقل یکی از باکتری‌های شاخص ، تاثیر بازدارندگی نشان داده است و ۱۲ ایزوله بر هیچ یک از باکتری های شاخص تاثیر بازدارندگی نداشتند. نکات قابل توجه از این جدول، اینکه اولاً در میان باکتری‌های شاخص بیماری‌زا، باکتری *E. coli* توسط بیشترین تعداد ایزوله‌ها (۱۱ ایزوله) و بعد از آن باکتری *Listeria. innocoa* توسط ۸ ایزوله و باکتری *Staph. aureus* توسط فقط ۲ ایزوله ممانعت شدند. در تحقیقی که توسط عدالتیان و همکاران (۲۰۱۱) روی باکتری‌های انتروکوکوس ایزوله شده از پنیرهای سنتی صورت گرفته بود، نتایجی مشابه با تحقیق حاضر بدست آمده بود بطوریکه در روش نفوذ در چاهک، باکتری شاخص *Staph. Aureus* توسط هیچ یک از ایزوله‌های انتروکوکوس ممانعت نشده بود. نکته قابل تامل دیگر اینکه، علیرغم تعداد بیشتر ایزوله‌هایی که اثر بازدارندگی روی باکتری *E.coli* نشان دادند، اما همانطور که از جدول ۳ بر می‌آید، این اثر بازدارندگی بصورت ضعیف می‌باشد اما در مورد باکتری لیستریا این تاثیر بازدارندگی بسیار قوی‌تر است. در تحقیقی که بر روی انتروکوکوس‌های ایزوله شده از پنیر لیقوان صورت گرفته بود، شاخص *لیستریا اینوکوآ* در بیشتر موارد به صورت خیلی قوی‌تری در مقایسه با سایر شاخص‌ها، توسط ۱۳ سویه از بین ۱۵ سویه انتروکوکوس ممانعت گردید (Edalatian, *et al*., 2012). این نتایج با یافته‌های حاصل از این پژوهش همخوانی دارد. دامنه بازدارندگی و فعالیت ضدمیکروب، در روش نفوذ در چاهک یا محیط کشت مایع، با آنچه در روش نقطه‌گذاری یا بر روی محیط کشت مایع مشاهده می‌شود، متفاوت است. این امر با گزارشات سایر محققان نیز همخوانی دارد بطوریکه فعالیت‌های ممانعت‌کنندگی مشاهده شده بر روی آگار همواره در مورد سوپرناتانت‌های فیلتر شده و خنثی شده (روش نفوذ در چاهک) مشاهده نمی‌شود. دلیل این امر وجود ترکیبات متابولیکی وابسته به کلونی[1] با فعالیت ضدمیکروبی، شامل اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و اسیدهای چرب می‌باشد که در روش نقطه‌گذاری وجود دارند و می‌توانند علت ظهور خاصیت ضدمیکروبی یا همان هاله شفاف بازدارندگی در روش نقطه‌گذاری شوند (De Vuyst & Leroy, 2007). مشخص شده است که بسیاری از انتروسین‌ها و انتروکوکوس‌های مولد انتروسین بر علیه باکتری پاتوژن‌های ناشی از غذا[2] *Listeria monocytogenes* فعالیت ضدمیکروبی دارند (Ibarguren, *et al*., 2010 ؛ Renye, *et al*., 2009). همانطور که از نتایج جدول ۳، بر می‌آید از بین باکتری‌های موثر بر باکتری *Listeria monocytogenes*، برخی از آنها از جنس انتروکوکوس هستند. ممانعت از رشد گونه‌های جنس لیستریا و سایر پاتوژن‌هایی از قبیل *Staph. Aureus* بوسیله سویه‌های مولد انتروسین، استفاده و کاربرد این سویه‌ها را در حفظ ایمنی مواد غذایی مختلف، افزایش می‌دهد (Foulquié Moreno, *et al*., 2006).

در مرحله بعد، برای تاثیر پارامترهای تکنولوژیکی pH ، درجه حرارت و آنزیم پروتئاز بر روی خاصیت ضدمیکروبی و بازدارندگی سوپرناتانت فاقد سلول باکتری‌ها، بر اساس نتایج بدست آمده در جدول۳، در روش نفوذ در چاهک، فقط آن دسته از ایزوله‌هایی انتخاب شدند که بر روی باکتری شاخص *لیستریا منوسیتوژنز* موثر بودند و

1 Colony- associated metabolic compounds
2 Food- borne pathogen

هاله شفاف بازدارندگی تولید کرده بودند.

تاثیر درجه حرارت‌های مختلف بر فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول (CFS)

در این مرحله، حساسیت یا مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی یا شبه باکتریوسینی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول در برابر حرارت‌های ۳۰°C به مدت ۹۰ دقیقه، ۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰°C به مدت ۱۵ دقیقه و بالاخره توسط اتوکلاو (۱۲۱°C) به مدت ۱۵ دقیقه در جدول ۴، سنجیده شد. ایزوله‌های انتخاب شده برای این آزمون، ۸ ایزوله‌ای بودند که بر اساس نتایج جدول ۳، در تکنیک نفوذ در چاهک بر علیه باکتری لیستریا، تاثیر ضدمیکروبی انها اثبات شده بود. نمونه شاهد یا کنترل در این آزمون، سوپرناتانتی بود که هیچ تیمار حرارتی بر روی آن اعمال نشده بود.

جدول ٤- تاثیر تیمارهای مختلف حرارتی بر حساسیت ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول بر اساس قطر هاله بازدارندگی بر حسب میلی‌متر

شماره	کد باکتری	نام باکتری	باکتری شاخص *Listeria monocytogenes*				
			30°C , 90 min.	65°C, 30 min.	100°C, 15 min.	121°C, 15 min.	Control (untreated CFS)
۱	B170	*Str. thermophilus*	۸/۵ ± ۰/۷ [cde]	۷/۷۵ ± ۰/۳۵ [efg]	۴/۵±۰ [hi]	۴/۷۵± ۰/۳۵ [hi]	۹/۷۵ ± ۰/۳۵ [a*]
۲	B164	*Ent. faecium*	۸/۲۵± ۰/۳۵ [cdef]	۷/۵±۰ [fg]	۵±۰ [hi]	۴/۷۵± ۰/۳۵ [hi]	۸/۷۵± ۰/۳۵ [bcd]
۵	Y11	*Ent. durans*	۷/۷۵±۰/۳۵ [efg]	۷/۷۵±۰/۳۵ [efg]	۴/۲۵±۰/۳۵ [i]	۴/۵±۰ [hi]	۸/۷۵±۰/۳۵ [bcd]
۳۰	B227	*Aerococcus viridians*	۷/۷۵±۰/۳۵ [efg]	۷/۲۵±۰/۳۵ [g]	۴/۲۵±۰/۳۵ [i]	۴/۲۵±۰/۳۵ [i]	۸/۵±۰/۷ [cde]
۳۲	M165	*Aerococcus viridians*	۷/۷۵±۰/۳۵ [efg]	۷/۲۵±۰/۳۵ [g]	۵/۲۵±۰/۳۵ [h]	۴/۷۵±۰/۳۵ [hi]	۸/۵±۰/۷ [cde]
۳۳	M171	*Aerococcus viridians*	۸/۵±۰ [cde]	۷/۷۵±۰/۳۵ [efg]	۴/۵±۰ [hi]	۴/۷۵±۰/۳۵ [hi]	۹/۵±۰/۷ [ab]
۳۴	M141	*Aerococcus viridians*	۸/۷۵±۰/۳۵ [bcd]	۷/۷۵±۰/۳۵ [efg]	۴/۷۵±۰/۳۵ [hi]	۴/۲۵±۰/۳۵ [i]	۹/۵±۰/۷ [ab]
۳۵	M156	*Aerococcus viridians*	۹±۰/۷ [abc]	۸±۰ [defg]	۴/۷۵±۰/۳۵ [hi]	۴/۲۵±۰/۳۵ [i]	۹/۵±۰/۷ [ab]

* اعداد میانگین دو تکرار به همراه انحراف معیار هستند. قطر هاله بر حسب میلی‌متر بیان شده است.حروف متفاوت در هر سطر، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد (α=۵٪) می‌باشد.

همانطور که از داده‌های جدول ۴، مشخص است با افزایش درجه حرارت از دمای ۳۰ به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله بازدارندگی روند کاهشی را نشان می‌دهد. این امر، نشان‌دهنده این حقیقت است که این ترکیبات ضدمیکروبی، حساس به حرارت بوده و در مقایسه با نمونه شاهد، قطر هاله شفاف در تمام دماها ، کمتر بوده است. اما در بین ایزوله های موجود در جدول۴، سوپرناتانت دو ایزوله M141 و M156 که *Aerococcus viridians* شناسایی شده‌اند، دارای بیشترین حساسیت یا کمترین مقاومت در برابر شرایط حرارتی اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) بودند. بر اساس معادله ۱، این امر به دلیل بیشترین کاهش در قطر هاله مشاهده شده (Δd، اختلاف قطر هاله در حالت شاهد یا کنترل با قطر هاله در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد می‌باشد).

$$\Delta d = d_{control} - d_{121C} \qquad (۱)$$

بر همین اساس، مقاومترین سوپرناتانت ایزوله در برابر حرارت، که دارای کمترین حساسیت و حداقل Δd، بوده است، ایزوله M165 ، *Aerococcus viridians* مشخص گردید. بطور کلی، اکثر باکتریوسین‌ها و ترکیبات شبه باکتریوسینی،که دارای وزن مولکولی پایین هستند، این رفتار را با افزایش دما، از خود نشان می‌دهند (Park, *et al*., 2003 ؛ Muriana & Klaenhammer,1991 ؛ Martı´n-Platero, *et al*., 2006).

تاثیر سطوح مختلف pH بر عصاره فاقد سلول باکتریایی (سوپرناتانت)

بمنظور بررسی مقاومت ترکیبات شبه باکتریوسینی در برابر سطوح مختلف pH، مقاومت عصاره فاقد سلول یا سوپرناتانت در pHهای مختلف ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ به کمک روش نفوذ در چاهک، ارزیابی گردید. نتایج این آزمون در جدول ۵، مشخص شده است.

جدول۵- اثر pHهای مختلف بر مقاومت یا حساسیت ترکیبات شبه باکتریوسینی موجود در عصاره فاقد سلول ایزوله‌ها بر حسب قطر هاله بازدارندگی (بر حسب میلی‌متر)

شماره	کد باکتری	نام باکتری	باکتری شاخص (*Listeria monocytogenes*)									
			pH=3		pH=5		pH=7		pH=9		pH=11	
			control	CFS	control	CFS	control	CFS	control	CFS	control	CFS
۱	B170	*Str. thermophilus*	۸±۰	^{a}۱۳±۱/۴۱	۵±۰	^{de}۱۰±۰	❋۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۲	B164	*Ent. faecium*	۷±۱/۴۱	^{ab}۱۲/۵±۲/۱۲	۴/۵±۰/۷۰	^{de}۱۰±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۵	Y11	*Ent. durans*	۸±۰	^{ab}۱۲/۵±۰/۷	۵±۰	^{de}۱۰±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۰	B227	*Aerococcus viridians*	۸/۵±۰/۷	^{cde}۱۰/۵±۰/۷	۶±۱/۴۱	^{fg}۸±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۲	M165	*Aerococcus viridians*	۹±۱/۴۱	^{abc}۱۲±۲/۸۲	۸±۲/۸۲	^{de}۱۰±۲/۸۲	۰	^{gh}۶/۵±۰/۷	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۳	M171	*Aerococcus viridians*	۸±۱/۴۱	^{bcd}۱۱±۱/۴۱	۵/۵±۰/۷	^{fgh}۷/۵±۰/۷	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۴	M141	*Aerococcus viridians*	۸±۱/۴۱	^{abc}۱۲±۰	۶±۱/۴۱	^{ef}۹±۱/۴۱	۰	^{h}۶±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۵	M156	*Aerococcus viridians*	۸±۰	^{ef}۹±۰	۰	^{gh}۷±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰

❋ قطر چاهک در این آزمون ۴ میلی‌متر بوده است و قطر چاهک در این حالت از قطر هاله کم شده است.حروف متفاوت در هر سطر، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد (α=۵٪) می‌باشد.

ارزیابی‌های فعالیت آنتاگونیستی (ضدمیکروبی) سوپرناتانت فاقد سلولی باکتریایی در pHهای مختلف نشان داد که در pHهای بین ۳ تا ۵، فعالیت بازدارندگی یا قطر هاله بازدارندگی، نسبت به حالت تیمار نشده افزایش دارد که این امر به دلیل اسیدیته ناشی از اسید لاکتیک تولید شده می‌باشد. حداکثرفعالیت ضدمیکروبی یا آنتاگونیستی در pH=۳ مشاهده شد و با افزایش pH به سمت خنثی و قلیایی، روند کاهشی نشان داد. Cardoso و همکاران (۲۰۱۲) روند مشابهی را برای فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت باکتری *Ent. faecalis* DBFIQ E24 با افزایش pH مشاهده کردند. فعالیت ضدمیکروبی در تحقیق این دانشمندان بصورت اندکی تحت تاثیر pH محیط کشت قرار گرفت و بطور معکوس متناسب با pH می‌باشد. بر خلاف این نتایج، Martı´n-Platero و همکاران (۲۰۰۶)، و Sparo و همکاران (۲۰۰۶)، تغییری در فعالیت ضدمیکروبی در دامنه pH ۴ تا ۸ ، مشاهده نکردند. نکته قابل توجه و جالب در جدول ۴، مربوط به دو ایزوله M165 و M141 است که هردو متعلق به گونه *Aerococcus viridians*می‌باشند و در pH خنثی برابر با ۷، قطر هاله بازدارندگی برابر با ۶/۵ و ۶ داده‌اند، با توجه به اینکه در این pH، اثر اسید خنثی شده است، می‌توان ایجاد هاله شفاف را به ترکیبات ضدمیکروبی یا شبه باکتریوسینی غیر از اسید لاکتیک تولید شده توسط این ایزوله‌ها نسبت داد. همچنین شکل ۲، هاله شفاف حاصل از بازدارندگی سویه *Aerococcus viridians* بر روی باکتری شاخص *Listeriainnocoa* را در pHهای مختلف (۳ تا ۱۱) نشان می‌دهد.

شکل ۲-هاله شفاف حاصل از بازدارندگی سویه *Aerococcus viridians* روی باکتری شاخص *Listeria innocoa* در pHهای مختلف (۳ تا ۱۱).

تاثیر آنزیم پروتئیناز K بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

نتایج حاصل از آزمون آنزیم پروتیئناز K، روی سوپرناتانت فاقد سلول ۸ ایزوله مورد آزمون، در جدول ۵، آورده شده است.

جدول ۵- اثر آنزیم پروتئیناز K ، بر مقاومت یا حساسیت ترکیبات شبه باکتریوسینی موجود در عصاره فاقد سلول ایزوله‌ها بر حسب قطر هاله بازدارندگی (بر حسب میلی‌متر)

شماره	کد باکتری	نام باکتری	باکتری شاخص (*Listeria monocytogenes*)		
			Proteinase K+ CFS	Control(BHI + Proteinase K)	untreated CFS
۱	B170	*Str. thermophilus*	f۰	f۰	a*۹/۷۵ ± ۰/۳۵
۲	B164	*Ent. faecium*	d۳/۵±۰/۷	f۰	bc۸/۷۵± ۰/۳۵
۵	Y11	*Ent. durans*	f۰	f۰	bc ۸/۷۵±۰/۳۵
۳۰	B227	*Aerococcus viridians*	e۲/۵±۰/۷	f۰	c۸/۵±۰/۷
۳۲	M165	*Aerococcus viridians*	f۰	f۰	c۸/۵±۰/۷
۳۳	M171	*Aerococcus viridians*	f۰	f۰	ab۹/۵±۰/۷
۳۴	M141	*Aerococcus viridians*	f۰	f۰	ab۹/۵±۰/۷
۳۵	M156	*Aerococcus viridians*	f۰	f۰	ab۹/۵±۰/۷

قطر چاهک در این آزمون ۴ میلی‌متر بوده است. قطر هاله از قطر چاهک کم شده است.

همانطور که ملاحظه می‌شود، آنزیم پروتئولیتیک پروتئیناز K، روی خاصیت ضدمیکروبی سوپرناتانت همه ایزوله‌ها، به جز دو مورد، تاثیر داشته است بطوری‌که هاله بازدارندگی آنها، صفر شده است. این پدیده، مبین این حقیقت است که ماهیت ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت این ایزوله‌ها، می‌تواند پروتئینی باشد، چراکه مورد تجزیه و غیرفعال شدن یک آنزیم پروتئولیتیک قرار گرفته است. اما، در مورد دو ایزوله B164 (*Ent. faecium*) و B227 (*Aerococcus viridians*)، حتی پس از تاثیر و تیمار با آنزیم پروتئیناز K، هاله شفاف بازدارندگی مشهود بوده است. با این آزمون، می توان نتیجه گرفت که ماهیت ضدمیکروبی ترکیبات موجود در سوپرناتانت سایر ایزوله ها به استثناء این دو ایزوله فوق‌الذکر، می‌تواند پروتئینی باشد.

نتیجه‌گیری

از بین ۵۱ ایزوله باکتری اسید لاکتیک که از مراحل مختلف تولید کره سنتی مسکه جداسازی شده بود، ۴۴ ایزوله ، در روش نقطه‌گذاری، حداقل روی یکی از باکتری‌های شاخص (اعم از باکتری‌های شاخص بیماری‌زا و یا غیر بیماری‌زا) موثر بوده است. در حالیکه در روش نفوذ در چاهک، ۳۹ ایزوله، حداقل بر یکی از باکتری‌های شاخص مورد آزمون، اثر ممانعت‌کنندگی داشته است. در روش نقطه‌گذاری، دو ایزوله B161(*Ent. faecium*) و B258 (*Str.thermophillus*) بیشترین قطر هاله بازدارندگی و در نتیجه بیشترین فعالیت ممانعت‌کنندگی را روی باکتری شاخص *Listeria innocoa*، از خود نشان دادند. اما در روش نفوذ در چاهک، باکتری شاخص *E.coli*، توسط بیشترین تعداد ایزوله‌ها ممانعت شده بود، اما باکتری شاخص *Listeria innocoa*، با توجه به تعداد کمتر ایزوله‌هایی که مورد ممانعت قرار گرفته بود، اما قدرت بازدارندگی این ایزوله‌ها بر روی شاخص *Listeria innocoa*، از نظر قطر هاله بازدارندگی بیشتر بود. در نهایت تعداد ۸ ایزوله از مرحله نفوذ در چاهک که دارای اثر ممانعت‌کنندگی بر روی شاخص *Listeria innocoa* بودند برای مراحل بعدی انتخاب شدند. سپس تاثیر پارامترهای مختلف تکنولوژیکیبا فیزیکوشیمیایی از جمله درجه حرارت‌های مختلف، pHهای متفاوت و آنزیم پروتئیناز K، روی فعالیت ممانعت‌کنندگی سوپرناتانت فاقد سلول ۸ ایزوله (بر روی باکتری شاخص *Listeria innocoa*) بررسی و مشخص گردید. در آزمون اثر حرارت، مقاوم‌ترین سوپرناتانت فاقد سلول در برابر حرارت، متعلق به ایزوله M165، *Aerococcus viridians* بود. در آزمون اثر pH، فقط دو ایزوله M165 و M141 که هردو متعلق به گونه *Aerococcus viridians* می‌باشند، در pH خنثی برابر با ۷، قطر هاله بازدارندگی برابر با ۶/۵ و ۶ داده‌اند، که از این حیث حائز اهمیت هستندکه می‌توان ایجاد هاله شفاف را به ترکیبات ضد میکروبی یا شبه باکتریوسینی غیر از اسیدلاکتیک تولید شده توسط این ایزوله‌ها نسبت داد. در آزمون تاثیر پروتئیناز K ، تنها دو ایزوله B164 (*Ent.faecium*) و ایزوله B227 (*Aerococcus viridians*) پس از تیمار با آنزیم مورد نظر، فعالیت بازدارندگی خود را همچنان حفظ کردند و سایر ایزوله‌ها، هیچ فعالیت بازدارندگی از خود نشان ندادند. این مسئله می‌تواند احتمال این واقعیت را قوت بخشد که ترکیبات ضدمیکروبیا شبه باکتریوسینی در این دو ایزوله، ماهیت غیرپروتئینی داشته باشند. چون علیرغم تجزیه ترکیبات پروتئینی توسط آنزیم پروتئولیتیک پروتئیناز K،در سوپرناتانت این دو ایزوله، ولی باز هم ما شاهد هاله شفاف حاصل از بازدارندگی بودیم. در پایان می‌توان این چنین نتیجه گرفت که چنانچه بخواهیم از این ایزوله‌ها یا سوپرناتانت فاقد سلول آنها بعنوان نگهدارنده‌های بیولوژیکی[1]، استفاده نماییم، می‌توان از ایزوله M165 (*Aerococcus viridians*) در مواد غذایی که فرایند حرارتی بالا برای آنها استفاده می‌شود، استفاده نمود، زیرا

1Biopreservative

ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت این ایزوله، مقاومت حرارتی بیشتری از خود نشان داد. در مواد غذایی اسیدی و با pH پایین، می‌توان از ایزوله‌هایی استفاده کرد که سوپرناتانت آنها در pHهای پایین، فعالیت ضدمیکروبی خود را حفظ کرده‌اند و در مواد غذایی با pH خنثی از ایزوله‌های M165 و M141 که این pH فعالیت ضدمیکروبی خود را حفظ کرده‌اند، بهره جست. در پایان پیشنهاد می‌شود که قبل از استفاده از این ایزوله‌ها یا سوپرناتانت فاقد سلول آن‌ها، مطالعات در داخل مواد غذایی یا *in Situ* نیز جهت اطمینان از قابلیت کاربرد آنها در مواد غذایی، انجام داد.

قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات جناب آقای مهندس قزوینی که در انجام آزمایش‌ها ما را یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌کنند. مقاله علمی– پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۲، با کد ۲۳۱۱۰ در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت یاری رساندن در انجام طرح کد ۲۳۱۱۰ صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

منابع

Alegría, A., Alvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 44-51.

Cardoso, M. D. L. M., Manzo, R. M., Tonarelli, G. G., and Sionetta, A. C. 2012. Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of Enterococcus faecalis DBFIQ E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), pp:568-577.

Chen, H. 2003. Bacteriocins and their food applications. CRFSFS, 82-100.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788.

De Vuyst, L., Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:194–199.

Edalatian, M. R., Habibi Najafi, M. B., Mortazavi, S. A., Alegría, A., Delgado, S., Bassami, M. R., Mayo, B. 2012.Production of bacteriocins by Enterococcus spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *Eur Food Res Technol* , 234:789–796.

Edalatian, M. R., Habibi Najafi, M. B., Mortazavi, S. A., Alegría, A., Nassiri, M. R., Bassami, M. R., Mayo, B. 2012. Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. *Dairy Sci Technol*. 92:75-90.

Fleming, H. P., Etchells, J. L., Costilow, R. L. 1985. Microbial inhibitionby an isolate of Pediococcus from cucumber brines. *Appl Microbiol*30:1040–1042

Foulquié Moreno, M., Rea, M. C., Cogan, T. M., De Vuyst, L. 2006. Applicability of a bacteriocin-producing Enterococcus faecium as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int J Food Microbiol* 81:73–84.

Guinane, C. M. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol*, 1316-1325.

Ibarguren, C., Raya, R. R., Apella, M.C., Audisio, M.C. 2010.Enterococcus faecium isolated from honey synthesized bacteriocin-like substances active against diVerent Listeria monocytogenes strains. *J Microbiol* 48:44–52.

Idoul, T., and Karam, N. 2008. Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites*, 59 (4): 361-367.

Khay, E.O., Idaomar, M., Castro, L. M. P., Bernardez, P. F., Shanhaji, N. S., Abrini, J. 2011. Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(51), pp: 10447-10455.

Lou, F., Feng, S.,Qun, S., Xiang, W., Zhao, J., Zhang, J., and Yang, Z. 2011. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai-Tibet plateau. *Food Control*, 22, pp: 50-53.

Martı´n-Platero A M, Valdivia E, Ruı´z-Rodrı´guez M, Soler J J, Martı´n- Vivaldi M, Maqueda M and Martı´nez-Bueno M. 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by Enterococcus faecalis MRR 10- 3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (Upupa epops). *Applied and Environmental Microbiology* 72 4245–4249.

Muriana P M and Klaenhammer T R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus 11088. *Applied and Environmental Microbiology* 57 114–121.

Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of Listeria spp. infood. *J. Food Protect*. 59 (Suppl.), 54–63.

Nandakumar, R. 1999. Quantification of nisin in flow-injection immunoassay system. *Biosens Bioelec*, 241-247.

Olasapo, N. A. 1999. Occurrence of nisin z production in Lactococcus lactis BFE 1500 isolated from wara, a traditional

Nigerian cheese product. *Int J Food Microbiol*,141-152.

Parente, E., Hill, C. 1992. Characterization of enterocin 1146, abacteriocin from Enterococcus faecium inhibitory to Listeriamonocytogenes. *J. Food Protect. 55*, 497–502 .

Park S H, Itoh K and Fujisawa T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by Enterococcus faecium JCM 5804T. *Journal of Applied Microbiology* 95 294–300.

Renye JA, Somkuti GA, Paul M, van Hekken DL. 2009. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by Enterococcus faeciumand Enterococcus duransisolates from Hispanic-style cheeses. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:261–268.

Riley, M. A., Chavan. M. A. 2007. Bacteriocins, Ecology and Evolution, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp:53-81.

Rodriguez, E., Gonzalez, B. 2006. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*,10: 7-15.

Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394-406.

Schleifer K H .1986. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Schleifer KH and Kilpper-Briltz R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst Appl Microbiol* 10: 1-19. doi: 10.1128/JCM.42.2.497-504.2004

Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD and Fischer W.1985. Transfer of Streptococcus lactis and Related Streptococci to the Genus Lactococcus gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 6: 183–195. doi: 0.1016/S0723-2020(85)80052-7

Sparo M D, Castro M S, Andino P J, Lavigne M V, Ceriani C, Gutie´rrez G L, Ferna´ndez M M, De Marzi M C, Malchiodi E L and Manghi M A .2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of Enterococcus faecalis. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 123–134.

Van Hoorde, K., and Verstraete,T. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*, 25: 929– 935.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 438-452

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۵۲-۴۳۸

Evaluation of antimicrobial activities of lactic flora isolated from production stages of Maskeh against food indicator bacteria

M. R. Edalatian Dovom[1*], M. Yavarmanesh[2], F. GhiamatiYazdi[3], M. Khomeiri[4], N. Nayyeri [5]

Received: 2014.06.11
Accepted: 2014.11.05

Introduction: Lactic acid bacteria (LAB) are a group of gram positive, catalase negative bacteria which possess unique metabolic, physiological and morphological characteristics. In addition, lactic acid bacteria are considered as a valuable source of antimicrobial agents including bacteriocins. Bacteriocins are defined as non-toxic peptides produced by LAB. "Maskeh" as an Iranian traditional butter carries indigenous LAB which secrete and harbor bacteriocins. Our objective in this study was to evaluate the influence of antimicrobial compoundsproduced by isolated LAB from Maskeh, a local traditional butter, against some pathogenic bacteria suchas: *staphylococcus aureus*, *Listeria innocoa* and *E. coli* using culture-based methods. In the following step, influence of some technological parameters including different temperatures, pHs and proteinase K were determined on stability of antimicrobial compounds in bacteriocins.

Materials and methods: Three samples of milk, yoghurt and local butter known as Maskeh were collected from different regions in the south ofKhorasanRazavi, Gonabadcity.

Indicator microorganisms and culture condition: In order to activate the indicators, following the cultivation in corresponding and suitable media, they were incubated for 24 hours in suitable temperatures.

Survey of antimicrobial activities: In Agar Spot, Antagonistic activities of isolates were evaluated in solid media. Finally clear zone of inhibition was measured in mm. In Well- Diffusion Assay (WDA), positive isolates from previous step, were selected for this assay. In this method, cell-free supernatant (CFS) of isolates were examined for their antagonistic activities. Finally clear zone of inhibition were evaluated around the wells.

Determination of antimicrobial compound nature: Effect of proteinase K on CFS: In order to evaluate the enzyme sensitivity of bacteriocin like compounds produced by LAB, CFS of isolates were subjected to proteinase K (final concentration 0.5 mg/ml). Mixture of enzyme- CFS was incubated in 37C for four hours. Finally, the remaining inhibitory activity was determined using WDA.

Influence of different temperatures on CFS: Heat sensitivity of bacteriocin like compounds was evaluated with subjecting the CFS of isolates to various temperatures. Again remaining activity of isolates was evaluated with the help of WDA.

Influence of different levels of pH on CFS: CFS of isolates was adjusted at different pHs and their inhibitory effects were determined using WDA.

Discussion & Results: Following the sequencing, 51 isolates were identified from different steps of Maskeh production. Results showed that 44 out of 51 isolates were effective at least against one indicator. It was clear that *E.coli*, *Staph.aureus, Listeria. innocoa*, *Lb.plantarum, Lb.sake, Lac.lactis* ssp. lactis,*Lac.lactis* ssp. *cremoris* were inhibited by 33, 7,11,12,7,35 and 7 isolates, respectively. Among pathogenic indicator bacteria, *E.coli* was inhibited maximally and regarding the non-pathogenic indicators, Lac.lactis ssp. Lactis was inhibited by the most of the isolates. Among the isolates, *Ent.faecium* B161 and *Str.thermophilus* B258 presented the highest inhibitory effect against *Listeria.innocoa*.Interestingly both these strains had been isolated from Maskeh, implying that they originated the same source. Formation of clear inhibition zone in agar spot method is related to colony-associated antimicrobial compounds like H_2O_2, lactic acid and other organic acids. Also, the strongest clear zone of inhibition was against *Listeria.innocoa*. *Lb.plantarum* B120 showed inhibitory effect against 6 out of 7 indicator bacteria. This strain has been isolated from Maskeh, and only did not affect on *Lac.lactis* ssp. *lactis*.In the next step, in WDA, CFS obtained from isolates were subjected to inhibition activity evaluation. In

1, 2 and 5. Assistant Professors and Former MSc Student,, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad.
3- Ph.D Student of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan Iran.
4- Associate Professor,Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences andNatural Resources.
(*-Corresponding Author Email: edalatian@um.ac.ir)

this assay, 39 isolates showed inhibitory activity against at least one indicator and 12 isolates had no inhibition against indicators. *E.coli* was inhibited by the most of the isolates (11), followed by *Listeria.innocoa* by 8 and *Staph.aureus* by 2 isolates. But noticeable point is that the strongest influence was seen against Listeria. In the last step, influence of technological parameters such as : temperature, pH and enzyme were determined on antimicrobial and inhibitory activity of CFS. In this survey, only those isolates were chosen which showed inhibitory effect against *Listeria innocoa*. Regarding the temperature, with increasing of this factor, the diameter of clear zone had decreasing trend. This means that bacteriocin- like compounds are sensitive to heat. Among analyzed isolates, CFS of two isolates namely *Aerococcusviridans* M156 and M141 possess the highest sensitivity. In contrast, the highest resistance was related to *Aerococcusviridans* M165. Evaluation of antagonistic activity of CFS of isolates at different pHsexperienced, in pH between 3-5, growing trend of inhibitory activity which is due to produced lactic acid. Maximum of antagonistic activity was seen at pH=3 and along with pH increase toward the alkaline condition, it decreased.*Aerococcusviridans* M165 and M141 showed clear zone of inhibition equal to 6.5 and 6, respectively at pH=7.Proteniase K as a proteolytic enzyme, exhibited decomposing influence on antimicrobial effects of all isolates, except two of them. This phenomenon implies the proteinaceous nature of antimicrobial compound in CFS, because of decomposition as a result of proteolytic enzyme. But regarding two isolates, the clear zone did mot destroyed even after enzyme treatment.

Conclusion: Some CFS or their producing isolates can be exploited as bio-preservatives; CFS of *Aerococcusviridans* M 165 can be applied in foods subjected to high heat treatment. In acidic and low pH food, we can use those isolates which theirCFS remain their activity at low pH.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Antagonistic Activity, Bacteriocin, Agar Spot, Well Diffusion Assay.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 453-462

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۶۲-۴۵۳

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی کانژوگه‌های پروتئین‌های سویای رسوب‌یافته با اسید و مالتودکسترین

ساره بوستانی[*1]، محمود امینلاری[*2]، مرضیه موسوی نسب[3]، مهرداد نیاکوثری[3]، غلامرضا مصباحی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸

چکیده

کانژوگه‌های پروتئین‌های سویای رسوب‌یافته با اسید و مالتودکسترین تحت شرایط کنترل شده واکنش مایلارد آماده شدند. (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، pH:۸، رطوبت نسبی ۷۹٪ و زمان‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ روز). تشکیل کانژوگه‌های پروتئین- پلی‌ساکارید با الکتروفورز SDS-PAGE تایید شد و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون نشان داد واکنش مایلارد بین پروتئین‌های سویا و مالتودکسترین رخ داده است. مطابق نتایج آنالیز گرماسنجی افتراقی (DSC)، پایداری حرارتی پروتئین‌های سویا بطور چشمگیری توسط کانژوگه شدن با مالتودکسترین افزایش یافت و بیشترین دمای دناتوراسیون بعد از ۷ روز گرمخانه‌گذاری مشاهده شد. در مقایسه با نمونه شاهد، خصوصیات حلالیت، کف‌کنندگی و امولسیفایری بطور قابل توجه‌ای با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری بهبود یافت. نتایج نشان داد که خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی پروتئین‌های سویا از طریق کانژوگه شدن با مالتودکسترین تغییر و بهبود می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌های سویا، پایداری حرارتی، خصوصیات عملکردی، کانژوگه

مقدمه

سویا به‌عنوان یکی از مهمترین منابع پروتئینی به علت دارا بودن ارزش غذایی بالا، خصوصیات عملکردی بی‌نظیر و قیمت مناسب شناخته شده است (Endres, 2001). پروتئین‌های سویا دامنه وسیع وزن ملکولی از ۸ تا ۶۰۰ کیلو دالتون دارند که بر اساس سرعت رسوب‌شان در اولتراسانتریفوژ نامگذاری شده‌اند (Kisenlla *et al.*, 1979). مهمترین اجزای پروتئینی سویا، گلوبولین 7S (بتاکان‌گلی سینین) و گلوبولین 11S (گلی‌سینین) می‌باشد که هر کدام از زیر واحدهای متفاوتی تشکیل شده و خصوصیات عملکردی پروتئین‌های سویا، عمدتاً به این دو گلوبولین نسبت داده شده است (Kilara and Sharkasi,. 1986). پروتئین‌های سویا در محصولات مختلفی چون نوشیدنی‌ها، محصولات گوشتی، آنالوگ‌های لبنی، انواع نان و کیک، دسر و سوپ مورد استفاده قرار می‌گیرند (Endres, 2001).

اغلب پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های سویا به فرم طبیعی و اصلاح نشده خواص عملکردی محدودی دارند و در مقابل حرارت و سایر عوامل آسیب‌رسان طی فرآیندهای غذایی بسیار حساس می‌باشند (Gan *et al*,. 2008) و محققین همواره در پی بهبود خصوصیات عملکردی و افزایش مقاومت این پروتئین‌ها بوده اند. برای افزایش پایداری و بهبود خصوصیات پروتئین‌ها، تیمارهای گوناگون شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی صورت می‌پذیرد و به کمک چنین روش‌هایی توانسته‌اند خواص عملکردی پروتئین‌های سویا را به میزان زیادی بهبود بخشند (Damodaran, 1996). با توجه به مخاطرات روش‌های شیمیایی و گران بودن روش‌های فیزیکی و آنزیمی، اصلاح پروتئین‌ها با استفاده از روش‌های طبیعی از اهداف اصلی تکنولوژیست‌های غذایی می‌باشد. از روش‌های جدید اصلاح پروتئین‌ها که نیازی به واکنشگر شیمیایی ندارد، کم هزینه و کاملاً طبیعی است، اصلاح با استفاده از واکنش مایلارد می‌باشد (Kato *et al*, 1991). در این واکنش، اتصال کووالانسی میان گروه‌های آمین آزاد پروتئین وگروه کربونیلی پلی‌ساکارید تحت شرایط کنترل شده رطوبت، حرارت، pH، نسبت مناسب واکنشگرها و غیره صورت می‌پذیرد (Kato *et al*,. 1992) و هیبریدهای سنگین و با وزن ملکولی متفاوت پروتئین- پلی‌ساکارید تشکیل می‌شود (Oliver *et al*, 2006).

مطالعات مختلفی در زمینه امکان بهبود پایداری حرارتی و خصوصیات عملکردی پروتئین ها از طریق کانژوگه شدن انجام شده است. Aminlari و همکاران (۲۰۰۵)، نشان دادند کانژوگه شدن با دکستران باعث بهبود خصوصیات عملکردی و پایداری حرارتی پروتئین‌های لیزوزیم و کازئین می‌شود. Diftis و Kiosseoglou (۲۰۰۳)، خصوصیات امولسیفایری پروتئین های سویا را از طریق کانژوگه شدن با کربوکسی متیل سلولز بهبود دادند. Van de

۱، ۲، ۳ و۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
(* - نویسنده مسئول: Email: aminlari@shirazu.ac.ir)

Lagemaat و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند واکنش‌های حساسیت‌زای پروتئین‌های سویا با کانژوگه شدن کاهش می‌یابد. بوستانی و همکاران (۱۳۹۵)، افزایش خصوصیات آنتی‌اکسیدانی کانژوگه‌های حاصل از پروتئین‌های سویای رسوب یافته با اسید و مالتودکسترین را گزارش کردند. Liu و همکاران (۲۰۱۲) افزایش چشمگیری در خصوصیات عملکردی پروتئین‌های بادام‌زمینی کانژوگه شده با دکستران مشاهده نمودند. انتخاب صحیح و مناسب نوع گروه‌های آمین و کربونیل، نوع پروتئین و پلی‌ساکارید شرکت کننده در واکنش، زمان، pH، نسبت مناسب کربوهیدرات به پروتئین، فعالیت آبی و دما در جهت کنترل سرعت و نوع واکنش مایلارد و نیز هدایت آن به سمت تشکیل کانژوگه‌های دلخواه بسیار مؤثر است Van (Boekel *et al*, 2001).

مالتودکسترین منبع کربوهیدراتی است که به وفور و با قیمت مناسب در دسترس می‌باشد. بر اساس قوانین سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۸۳، مالتودکسترین‌ها به‌عنوان پلیمرهای ساکاریدی غیرشیرین و غیرمغذی با واحدهای D- گلوکز که با پیوند α-۱،۴ بهم متصل شده‌اند و دارای حداکثر معادل دکستروز[1] (DE) کمتر از ۲۰ هستند، تعریف شده‌اند. این پلی‌ساکارید کاربردهای متنوعی داشته از جمله به‌عنوان جایگزین چربی، در تهیه انواع پودرهای نوشیدنی، به‌عنوان پرکننده در محصولات غذایی مختلف و غیره بکار می‌رود (مولایی فر و همکاران، ۱۳۹۵).

با توجه به سهولت دسترسی و قیمت مناسب هر دو منبع پروتئینی و کربوهیدراتی ذکر شده، هدف این مطالعه بهبود مقاومت و خصوصیات عملکردی پروتئین های سویا از طریق گلیکوزیله شدن[2] با مالتودکسترین و بررسی تغییرات خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی کانژوگه‌های تشکیل شده طی واکنش مایلارد با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

لوبیای سویا (واریته ویلیامز) از بازار محلی تهیه و توسط هگزان روغن‌گیری شد (نسبت حلال به سویا، ۱/۷۵ به ۱ و روغن‌گیری به صورت غیرمداوم و با استفاده از روش غوطه‌وری مشابه روغن‌گیری به روش سوکسله، در دمای ۶۵/۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد)، سپس سویای روغن‌گیری شده آسیاب گردید. مالتودکسترین و روغن ذرت نیز از بازار محلی تهیه شد. سفادکس G-100 از شرکت سیگمای آمریکا و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده، از شرکت‌های تولیدکننده معتبر مواد شیمیایی آزمایشگاهی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

1Dextrose equivalent
2 Glycosylation

تهیه پروتئین های سویای رسوب یافته با اسید[3]

خالص سازی پروتئین‌های سویا مطابق روش Iwabuchi and Yamauchi (1987) و با کمی تغییرات در چندین مرحله صورت پذیرفت. ابتدا خالص سازی پروتئین های سویا (۱۰۰ گرم) با ۲ لیتر بافر تریس اسیدی در pH: ۸ حاوی ۱۰ میلی مولار مرکاپتواتانول در دمای اتاق صورت گرفت و سپس سانتریفیژ شد، محلول رویی با اسیدکلریدریک ۲ مولار به pH: ۴/۸ رسانیده شد و مجدداً سانتریفوژ شد، رسوب بدست آمده با آب خنک، مخلوط و pH آن به ۸ رسانیده شد، در انتها محلول رویی جدا و دیالیز شد و با استفاده از خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل گردید. پودر حاصله حاوی گلوبولین‌های خالص سویا می‌باشد.

تهیه کانژوگه‌های پروتئین-پلی‌ساکارید

کانژوگه کردن پروتئین‌های خالص شده سویا با مالتودکسترین در شرایط حرارت خشک[4] انجام شد. ابتدا پروتئین‌های خالص شده سویا و مالتودکسترین به نسبت ۱ به ۳ در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH: ۸ کاملاً مخلوط و سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل گردید، پودر حاصل در دسیکاتور و در حضور برمید پتاسیم اشباع (رطوبت نسبی ۷۹٪) و در زمان‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا واکنش مایلارد انجام شود. یک نمونه به‌عنوان شاهد که حاوی ترکیبات پروتئینی بدون پلی‌ساکارید بود نیز در نظر گرفته شد (Kato *et al*, 1991).

الکتروفورز

برای تأیید تشکیل کانژوگه‌های پروتئین- پلی‌ساکارید، الکتروفورز SDS- PAGE مطابق روش Laemmli (1970) و با کمی تغییرات صورت پذیرفت. ژل افقی الکتروفورز با ۳٪ ژل متراکم کننده و ۱۰درصد ژل جدا کننده تهیه شد و دستگاه الکتروفورز دو طرفه بیو راد ساخت سنگاپور مورد استفاده قرار گرفت. نمونه به غلظت ۲ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر در بافر نمونه مخلوط و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده و در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر نمونه تزریق شد. میزان جریان الکتریسیته روی ۲۵ میلی‌آمپر تنظیم شد و در انتها رنگ آمیزی در محلول محتوی کوماسی بریلیانت بلو و متانول و رنگ‌زدایی در محلول محتوی استیک اسید و متانول صورت پذیرفت.

انجام کروماتوگرافی به روش ژل فیلتراسیون

برای جداسازی پروتئین‌های سویای کانژوگه شده از غیر

3Acid-precipitated soy protein (SAPP)
4Dry heating

کانژوگه، از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون حاوی رزین سفادکس G-100 مطابق روش Janson (1998) استفاده شد. ستون به ابعاد ۷۰×۱/۵ سانتی‌متر تهیه شد و نمونه‌ها به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم توزین و در ۲ میلی‌لیتر بافر کربنات آمونیوم ۰/۰۱ میلی مولار با pH: ۷/۵ حل شدند و سپس با دور ۲۵۰۰×g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی جدا و برای نمونه‌گذاری روی ستون مورد استفاده قرار گرفت و در هر لوله ۳ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد. جذب نوری فراکسیون ها[1] در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین و کروماتوگرام مربوطه رسم گردید. کانژوگه‌های خالص شده برای آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرارگرفتند.

بررسی پایداری حرارتی با استفاده از تکنیک گرماسنجی افتراقی[2] (DSC)

اندازه‌گیری اختلاف در دمای واسرشت شدن نمونه‌های کانژوگه شده و شاهد مطابق روش Tang و همکاران (۲۰۰۷) و با ایجاد کمی تغییرات صورت پذیرفت. دستگاه ترمال آنالایزر متلر[3] ساخت سوئیس مورد استفاده قرار گرفت و در انتها، داده‌ها با نرم افزار STAR SW.9.3 آنالیز شد. بدین ترتیب که ابتدا، محلول آبی نمونه‌ها (غلظت ۲۰٪ حجمی/ وزنی و به میزان ۱۰ میکرولیتر) تهیه و در پن‌های آلومینیومی جاسازی شد و آنالیز از دمای ۲۵ تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰درجه سانتی‌گراد بر هر دقیقه صورت گرفت و در انتها، دمای واسرشت شدن[4] (T_d)، دمای اولیه[5] (T_0) و آنتالپی[6] (ΔH) از نمودارها استخراج و آنالیز گردید.

تعیین حلالیت پروتئین

اندازه‌گیری حلالیت نمونه‌ها در pHهای ۳، ۵، ۷ و ۹ مطابق روش امینلاری و همکاران (۲۰۰۵) و با کمی تغییرات صورت پذیرفت. ابتدا میزان پروتئین کل به روش کلدال اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پروتئین‌های موجود در مایع فوقانی بدین ترتیب عمل شد که ۳۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پروتئینی با ۱ سی‌سی بافر با pHهای مورد نظر در ۲۵ درجه سانتی‌گراد کاملاً مخلوط شد و در ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و میزان نیتروژن موجود در محلول رویی مطابق روش لوری و با تعیین میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر محاسبه گردید. فرمول زیر برای تعیین درصد حلالیت نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت.

1 Fractions
2Differential Scanning Calorimetry
3METTLER thermal analyser
4Denaturation temperature
5Onset temperature
6Denaturation enthalpies

۱۰۰× (محتوی پروتئین کل/ محتوی پروتئین در مایع فوقانی)= درصد حلالیت (۱)

تعیین ظرفیت کف کنندگی[7] و پایداری کف[8]

برای اندازه‌گیری ظرفیت کف‌کنندگی بدین صورت عمل شد که مقداری از نمونه‌ها که حاوی ۳ گرم پروتئین بود در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از مخلوط کن با سرعت بالا برای ۳ دقیقه کاملاً مخلوط شد و سپس در یک استوانه مدرج ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و حجم کف (ارتفاع کف بر حسب میلی‌لیتر) بعد از ۳۰ ثانیه ثبت و به‌عنوان ظرفیت کف‌کنندگی گزارش شد. پایداری کف بر اساس حجم کف (ارتفاع کف بر حسب میلی‌لیتر) در دقیقه سی ام اندازه‌گیری و محاسبه گردید (Chiu *et al*, 2009, Alhakkak *et al*, 2010, Appiah *et al*, 2011)

تعیین فعالیت امولسیون کنندگی[9] و پایداری امولسیون[10]

فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون مطابق روش Pearce and Kinsella (1978) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ابتدا یک میلی‌لیتر روغن ذرت به ۳ میلی‌لیتر نمونه به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH: ۷/۴ افزوده و کاملاً مخلوط شد، سپس با هموژنایزر با دور ثابت به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط هموژنیزه شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده در فواصل زمانی ۰ تا ۱۰ دقیقه برداشته و ۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات ۰/۱درصد به آن اضافه و بلافاصله جذب نوری آنها در طول موج ۵۰۰ نانومتر تعیین شد و منحنی مربوطه بر اساس میزان جذب و مدت زمان ۱۰ دقیقه رسم شد. فعالیت امولسیون‌کنندگی از طریق اندازه گیری میزان جذب بلافاصله پس از تشکیل امولسیون محاسبه شد (میزان جذب در زمان ۰). پایداری امولسیون تشکیل شده نیز با تعیین مدت زمانی که طول می کشد تا میزان کدورت اولیه امولسیون به نصف کاهش یابد، از روی منحنی جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر و در مدت ۱۰ دقیقه محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور آنالیز آماری داده ها و بررسی اطلاعات بدست آمده از آزمون‌های مختلف از طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شده و سپس میانگین و انحراف معیار بدست آمد. به منظور تعیین وجود اختلاف بین میانگین اعداد، از آنالیز واریانس و برای گروه‌بندی آنها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح

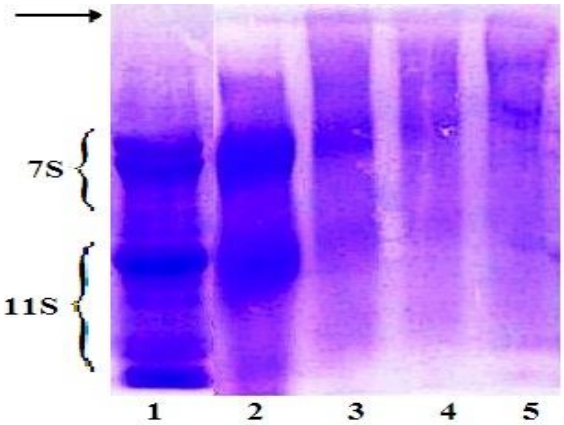
7Foaming capacity
8Foaming stability
9Emulsion activity
10Emulsion stability

۰/۰۵ استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز

الگوی الکتروفورز نمونه‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان یا درصد گلیکوزیله شدن[1] از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی است که بطور مستقیم بر خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارد و الکتروفورز یکی از راه‌های تعیین میزان پیشرفت کانژوگه شدن می‌باشد. در ستون شماره ۱ باندهای پروتئینی مربوط به گلوبولین‌های 7S و 11S به خوبی مشخص است. همان گونه که قابل انتظار است حرارت‌دهی خشک مخلوط پروتئین-کربوهیدرات در شرایط فعالیت آبی و دمای مناسب منجر به تشکیل هیبریدهای پروتئین-کربوهیدرات حاصل از واکنش مایلارد می‌شود (Kato *et al*, 1991).

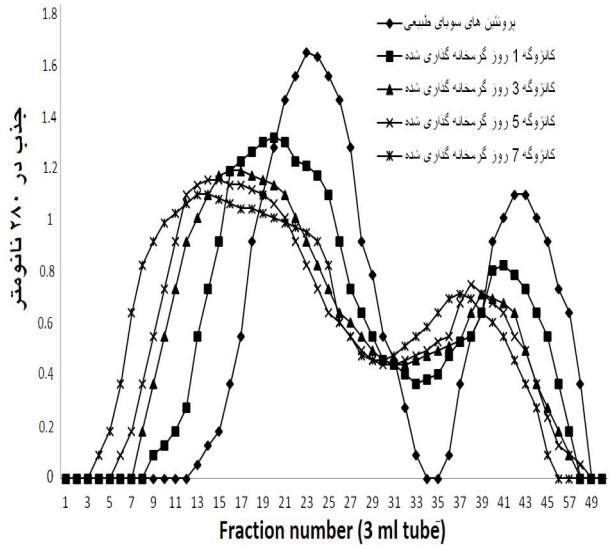


شکل ۱- الگوی الکتروفورز: پروتئین‌های سویای طبیعی (۱)، کانژوگه ۱ روز گرمخانه‌گذاری شده (۲)، کانژوگه ۳ روز گرمخانه‌گذاری شده (۳)، کانژوگه ۵ روز گرمخانه‌گذاری شده (٤)، کانژوگه ۷ روز گرمخانه‌گذاری شده (۵)

با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از ۱ روز به سمت ۷ روز، کانژوگه شدن رخ داده و پروتئین به کربوهیدرات متصل می‌شود در نتیجه وزن مولکولی افزایش و توزیع باندها در ابتدای ژل افزایش می‌یابد و باعث ظاهر شدن تدریجی یک باند کشیده، وسیع و متراکم در ابتدای ژل متراکم‌کننده که مربوط به اجزاء با وزن مولکولی بالای تشکیل شده در طی واکنش مایلارد می‌باشد، می‌شود. نتایج حاصل از الگوی الکتروفورز با گزارشات بدست آمده از سایر محققین مطابقت دارد، Aminlari و همکاران (۲۰۰۵) با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری مخلوط لیزوزیم با دکستران از زمان صفر تا یک هفته، Yadav و همکاران (۲۰۱۰) با کانژوگه کردن پروتئین‌های شیر و فیبر ذرت در زمان‌های ۲ تا ۷ روز و O'Regan و Mulvihill (۲۰۱۰) طی کانژوگه کردن پروتئین‌های کازئین با مالتودکسترین، مشاهده کردند که با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری ناپدید شدن تدریجی باندهای پروتئینی اصلی مشاهده می‌شود و همزمان باندهای جدید، تیره و وسیع با وزن ملکولی بالای کانژوگه‌ها در بالای ژل جداکننده ایجاد می شود .

نتایج کروماتوگرافی

کروماتوگرام[2] پروتئین‌های خالص سویا و کانژوگه‌ها در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، پروتئین‌های سویای طبیعی دو پیک عمده را نشان می‌دهد که مربوط به اجزای پروتئینی 7S و 11S می‌باشد در صورتیکه که کانژوگه‌ها یک پیک پهن را نشان می‌دهد که این حاکی از تشکیل کمپلکس‌های با وزن ملکولی بالا و متنوع پروتئین-مالتودکسترین می‌باشد. کروماتوگرام بدست آمده نتایج حاصل از الکتروفورز را تأیید می‌کند.



شکل ۲- کروماتوگرام پروتئین‌های سویا و کانژوگه‌ها

در یک مخلوط پروتئینی ملکول‌های کوچک وارد منافذ رزین شده و به آرامی خارج می‌شود در حالی که ملکول‌های بزرگتر قادر به نفوذ به منافذ رزین نبوده و با سرعت بیشتری از ستون خارج می‌شود (Aminlari *et al* 2005, Qi *et al*, 2009). از آنجا که کانژوگه‌ها بزرگتر می‌باشند در ابتدای کار از ستون خارج می‌شوند، بنابراین منحنی خروج آنها به سمت چپ نمودار منتقل می‌شود، از طرفی به دلیل نزدیک بودن وزن ملکولی گلیکوکانژوگه‌های سنگین تشکیل

1 Glycation degree

2 Chromatogram

شده در طی واکنش مایلارد، منحنی خروج آنها با پروتئین‌های گلیکوزیله نشده همپوشانی نشان داده و تقریباً به صورت یک پیک پهن گسترده مشاهده می‌شود. نتایج مشابهی نیز توسط Aminlari و همکاران (۲۰۰۵)، Qi و همکاران (۲۰۰۹)، Nakamura و همکاران (۱۹۹۲) بدست آمده است.

تعیین پایداری حرارتی با استفاده از DSC

پارامترهای استخراج شده از DSC نمونه پروتئین‌های سویای شاهد و گلیکوکانژوگه‌ها به شرح جدول ۱ می‌باشد. DSC بطورگسترده‌ای برای بررسی ویژگی‌های حرارتی پروتئین‌ها، از جمله دمای واسرشت شدن حرارتی و دمای انتقال شیشه‌ای بکار می‌رود (Tang *et al*, 2007).

جدول ۱- ویژگی‌های DSC پروتئین‌های سویای شاهد و کانژوگه‌ها

نمونه ها	پیک اول بتا کان گلی سینین (7S)		پیک دوم گلی سینین (11S)	
	T_d(°C)	ΔH(J/g)	T_d(°C)	ΔH(J/g)
پروتئین های سویای خالص	۷۳/۱ ± ۱/۰۵^{d}	۳ ± ۰/۰۸^{a}	۸۸/۹ ± ۱/۱۵^{d}	۴/۲ ± ۰/۰۴^{a}
کانژوگه ۱ روز گرمخانه‌گذاری شده	۷۵/۵ ± ۱/۳۵^{c}	۲/۶ ± ۰/۰۴^{b}	۹۱/۷ ± ۰/۹۸^{c}	۳/۷ ± ۰/۰۶^{b}
کانژوگه ۳ روز گرمخانه‌گذاری شده	۷۷/۳ ± ۱/۱۵^{b}	۲/۶ ± ۰/۰۷^{b}	۹۳/۱۵ ± ۱/۳۲^{b}	۳/۳ ± ۰/۰۸^{c}
کانژوگه ۵ روز گرمخانه‌گذاری شده	۷۷/۸ ± ۱/۱۱^{b}	۲/۵ ± ۰/۰۵^{b}	۹۵/۱ ± ۱/۰۱^{a}	۲/۷ ± ۰/۰۴^{d}
کانژوگه ۷ روز گرمخانه‌گذاری شده	۷۹/۶ ± ۱/۴۷^{a}	۲/۳ ± ۰/۰۶^{c}	۹۵/۶ ± ۱/۲۳^{a}	۲/۶ ± ۰/۰۵^{d}

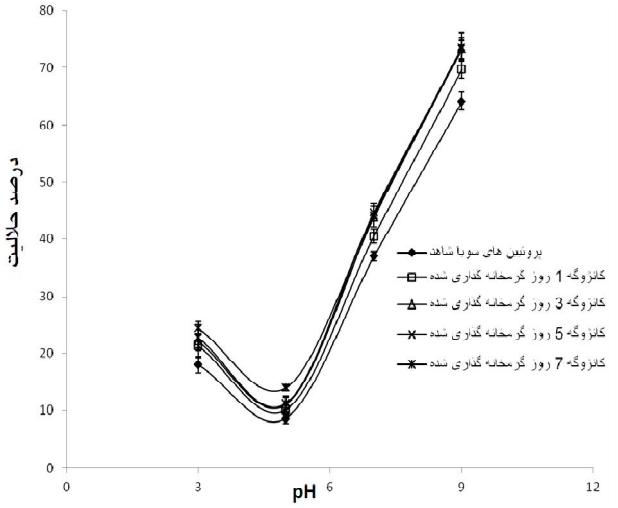
*اعداد موجود در جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

ترموگرام[1] DSC برای پروتئین‌های سویای خالص شده دو پیک اندوترمیک کاملاً واضح را نشان می دهد که نشان دهنده پروتئین‌های مختلف با دمای واسرشت شدن متفاوت می‌باشد که متعلق به واسرشت شدن بتاکان گلی‌سینین در دمای کمتر (۷۳/۱°C) و گلی سینین در دمای بالاتر (۸۸/۹ °C) می باشد، نتایج بدست آمده با گزارش Tang و همکاران (۲۰۰۷) مشابهت دارد. همانطور که مشاهده می‌شود، با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری دمای دناتوراسیون اجزای پروتئینی سویا افزایش می‌یابد، Liu و همکاران (۲۰۱۲) با کانژوگه کردن پروتئین‌های بادام زمینی و دکستران مشاهده کردند با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری، دمای دناتوراسیون نیز افزایش می‌یابد. دمای واسرشت شدن بالاتر، گویای افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌ها یا پایداری ساختار سوم در حالت گلیکوزیله شده در مقایسه با شاهد می‌باشد، با اتصال کووالانسی پلی‌ساکارید هیدروفیل و باردار به پروتئین، اتصالات هیدروژنی و الکتروستاتیک در ساختار سوم و چهارم پروتئین بیشتر شده و ساختار سوم پایدارتر می‌شود و در نتیجه دمای واسرشت شدن افزایش می‌یابد (Liu *et al*, 2012, Tang *et al*, 2007, Wang and Ismail, 2012, Xu *et al*, 2010).

بررسی تأثیر گلیکوزیله شدن بر حلالیت پروتئین‌ها

یکی از پارامترهای مؤثر در حلالیت پروتئین‌ها، pH محیط است که با تغییر آن، حلالیت پروتئین‌ها می‌تواند به میزان زیادی تغییر کند (Abtahi and Aminlari, 1997). نمودار معمول تغییر حلالیت پروتئین‌های سویا در مقابل تغییرات pH محیط به صورت یک منحنی U شکل است و پایین‌ترین نقطه این منحنی بین مقادیر pH ۴ و ۵ می باشد که نشان‌دهنده نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های سویا در این محدوده می‌باشد (Babiker *et al*, 1998). با گلیکوزیله کردن پروتئین‌های سویا مطابق شکل ۳، مشاهده می‌شود که حلالیت در تمامی pHها نسبت به نمونه کنترل بطور معناداری افزایش می‌یابد.

Chiu و همکاران (۲۰۰۹) و Liu و همکاران (۲۰۱۲)، نیز نتایج مشابهی مبنی بر بهبود حلالیت پروتئین‌ها با کانژوگه شدن مشاهده کردند. کانژوگه شدن با پلی‌ساکارید هیدروفیل و آبدوست، ارتباط[2] بین پروتئین و ملکول آب را بهبود می‌بخشد و در نتیجه باعث افزایش حلالیت پروتئین می‌شود (Babiker *et al*, 1998, Chiu *et al*, 2009, Liu *et al*, 2012)



شکل ۳- درصد حلالیت پروتئین‌های سویای شاهد و کانژوگه‌ها در pHهای مختلف

بررسی تأثیر گلیکوزیله شدن بر خصوصیات امولسیفایری

نتایج حاصل از فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون در جدول ۲ گزارش شده است، همانطور که مشاهده می‌شود، کانژوگه شدن باعث بهبود خصوصیات امولسیفایری می‌شود و با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری و پیشرفت کانژوگه شدن، روند بهبود این خصوصیات بیشتر می‌شود. نتایج مشابهی توسط Liu و همکاران (۲۰۱۲)، با کانژوگه کردن پروتئین‌های بادام زمینی و دکستران و Diftis و Kiosseoglou (۲۰۰۳)، با کانژوگه کردن پروتئین‌های سویا و

[1] DSC thermograms

2 Affinity

کربوکسی متیل سلولز گزارش شد. بالاتر بودن خصوصیات امولسیفایری گلیکوکانژوگه‌ها می‌تواند به دلیل تأثیر همزمان خصوصیات خوب امولسیفایری پروتئین و پایدارکنندگی پلی‌ساکارید در یک ملکول باشد که از جدا شدن چربی جلوگیری کرده و در نتیجه فعالیت امولسیفایری بهبود می‌یابد (Chiu *et el*, 2009, Diftis and Kiosseoglou, 2003). پروتئین‌ها در لایه بین سطحی آب و روغن[1] جذب شده تا یک لایه پیوسته ویسکوالاستیک را تشکیل دهد، در حالی که پلی‌ساکاریدها پایداری کلوئید را بواسطه خصوصیات قوام‌دهندگی[2] و ژله‌کنندگی[3] در فاز آبی، افزایش می‌دهند، بنابراین کانژوگه‌های پروتئین- پلی ساکارید خصوصیات خوب امولسیفایری را از خود نشان می‌دهد (Kato, 2002).

بررسی تأثیر گلیکوزیله شدن بر خصوصیات کف‌کنندگی

مطابق نتایج ارائه شده در جدول ۲ اختلاف آماری معنی‌داری بین پروتئین‌های شاهد و کانژوگه در ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف وجود دارد که با گزارش‌های Liu و همکاران (۲۰۱۲)، Al-hakkak (۲۰۱۰)، Achouri و همکاران (۲۰۰۵)، مشابهت دارد. ظرفیت کف‌کنندگی بالابه توانایی حلالیت[4] (پخش‌پذیری) پروتئین بستگی دارد (Liu *et al*, 2012). همانطور که در نمودار ۳ مشاهده شد، پروتئین‌های گلیکوزیله شده در مقایسه با شاهد حلالیت بیشتری دارد پس با سرعت بیشتری به لایه بین سطحی مهاجرت کرده، بنابراین ظرفیت کف‌کنندگی بالاتری مشاهد می‌شود. بعلاوه مالتودکسترین، یک کربوهیدرات هیدروفیل است که می‌تواند پایداری کف پروتئینی را از طریق عمل کردن به‌عنوان یک عامل قوام‌دهنده، افزایش دهد و با افزایش ویسکوزیته بخش مایع باعث افزایش پایداری کف شود (Achouri *et al*, 2005, Liu *et al*, 2012).

نتیجه گیری

در این مطالعه پروتئین های سویا از طریق واکنش مایلارد اصلاح گردید و مطابق نتایج بدست آمده، واکنش طبیعی مایلارد موجب بهبود مقاومت حرارتی و خصوصیات عملکردی پروتئین‌های سویا شد. نوع کربوهیدرات و شرایط واکنش بر میزان و پیشرفت کانژوگه شدن و در پی آن بهبود خصوصیات عملکردی موثر است و کانژوگه کردن با مالتودکسترین به عنوان منبع کربوهیدراتی ارزان قیمت، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH: ۸ و زمان ۷ روز می‌تواند باعث بهبود ویژگی‌های عملکردی و مقاومت این پروتئین‌ها گردد.

جدول ۲- خصوصیات امولسیفایری و کف‌کنندگی پروتئین‌های سویای شاهد و کانژوگه‌ها

نمونه ها	خصوصیات امولسیفایری			خصوصیات کف کنندگی	
	فعالیت امولسیفایری (A_{500})	پایداری امولسیون(min)	ظرفیت کف کنندگی(ml)	پایداری کف(ml)
پروتئین های سویای خالص	۰/۴۷±۰/۰۲[d]	۶/۴۴±۰/۲۷[c]	۱۲/۳۸±۱/۳۳[d]	۷/۶۶ ±۰/۷۱[d]
کانژوگه ۱ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۶±۰/۰۴[c]	۷/۵۱±۰/۱۳[b]	۱۳/۸۶±۱/۵۶[c]	۱۱/۱۷±۱/۱۳[c]
کانژوگه ۳ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۶۱±۰/۰۵[c]	۸/۰۲±۰/۴۱[a]	۱۳/۲۵±۱/۷۱[c]	۱۳/۰۲±۰/۸۴[b]
کانژوگه ۵ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۸۸±۰/۰۵[b]	۸/۲۳±۰/۲۵[a]	۱۵/۱۷±۱/۳۹[b]	۱۳/۱۵±۱/۰۱[b]
کانژوگه ۷ روز گرمخانه‌گذاری شده	۱/۰۴±۰/۰۷[a]	۸/۴۶±۰/۱۷[a]	۱۶/۶۳±۱/۴۵[a]	۱۴/۳۵ ±۰/۸۸[a]

اعداد موجود در جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می باشد.

1 Oil-water interface
2 Thickening
3 Gelation
4 Dispersing ability

منابع

بوستانی، س.، امینلاری، م.، موسوی نسب، م.، ۱۳۹۵، بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های سویای رسوب یافته با اسید از طریق کانژوگه شدن با مالتودکسترین با استفاده از واکنش مایلارد، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۱۳، ۹۳-۱۰۲.

مولایی فر، م.ح.، امینلاری، م.، نیاکوثری، ن.، بوستانی، س.، ۱۳۹۵، تأثیر تیمار مایکروویو بر میزان گلیکوزیله شدن کانژوگه‌های حاصل از واکنش مایلارد لیزوزیم- مالتودکسترین، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۱۳، ۱۰۵-۱۱۳.

Abtahi, S. and Aminlari, M. 1997. Effect of sodium sulfite, sodium bisulfite, cysteine, and pH on protein solubility and Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of soybean milk base. Journal of Agricultural and *Food Chemistry*,45: 4768-4772.

Aminlari, M. Ramezani, R. and Jadidi, F. 2005. Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 2617–2624.

Achouri, A. Boye, J. I. Yaylayan, V. A and Yeboah, F. K. 2005. Functional properties of glycated soy 11S glycinin. *Journal of Food Science*, 70: 269-274.

Al-hakkak, J. and Al-hakkak, F. 2010. Functional egg white–pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 100: 152–159.

Appiah F., Asibuo J.Y and Kumah P. 2011. Physical and functional properties of bean flours of three cowpea (Vigna unguiculata L. walp) varieties in Ghana. *African J. of Food Science*. 5(2): 100-104.

Babiker, E. Hiroyuki, A. Matsudomi, N. Iwata, H. Ogawa, T. Bando, N. and Kato, A. 1998. Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein. Journal of *Agricultural and Food Chemistry*, 46: 866-871.

Chiu T. Chen, M. and Chang, H. 2009. Comparisons of emulsifying properties of maillard reaction products conjugated by green, red seaweeds and various commercial proteins. *Food Hydrocolloids*, 23: 2270–2277.

Damodaran, S. 1996. Amino Acids, Peptides and Proteins. In: Food Chemistry, 3rd ed.; Fennema, O. R., Ed.; Dekker: *New York*. 321-330.

Diftis, N. and Kiosseoglou, V. 2003. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose. Food Chemistry, 81: 1–6.

Endres, J. G. 2001. Soy protein products characteristics, nutritional aspects, and utilization. AOAC Press, *Champaign* IL. 16-30.

Gan, C.Y. Cheng, L.H. and Easa, A.M. 2008. Assessment of Maillard reaction and cross-linking in transglutaminase-cross-linked powdered soy protein isolate gel. *Food Research International*. Communicating.

Janson, J.C. 1998. Protein purification, principle of high resolution methods and application, New York, WILEY-LISS. Inc.

Iwabuchi, S. and Yamauchi, F. 1987. Determination of glycinin and β-conglycinin in soy protein by immunological methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 200–205.

Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of food proteins: a rview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7:219-280.

Kilara, A. and Sharkasi, T.Y. 1986. Effect of temperature on food protein. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 23: 323-395.

Kato, A. 2002. Industrial applications of maillard-type protein- polysaccharide conjugates, *Food Science and Technology Research*,8: 193-199.

Kato, A. Shimokawa, K. and Kobayashi, K. 1991. Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1053-1058.

Kato, A. Mifuru, R. Matsudomi, N. and Kobayashi, K. 1992. Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating. Bioscience, *Biotechnology, andBiochemistry*,56:567–571.

Lowry, O. H., Rosembroug, H. J., Lewis, A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 19, 265–275.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Liu, Y. Zhao, G. Zhao, M. Ren, J. and Yang, B. 2012. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction, *Food Chemistry*, 131: 901–906.

Nakamura, S., Kato, A., and Kobayashi, K. 1992. Bifunctional lysozymegalactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:735–739.

Oliver, C. M. Stanley, R. A. and Melton, L. D. 2006. Creating proteins with novel functionality through the maillard reaction. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 337-350.

O'Regan, J. and Mulvihill, D. M. 2009. Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate–maltodextrin conjugates. *Food Chemistry*, 115, 1257–1267.

Pearce, K. M. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimeric technique.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26: 716-723.

Qi, J. R. Yang, X. Q. and Liao, J. S. 2009. Improvement of functional properties of acid-precipitated soy protein by the attachment of dextran through Maillard reaction. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2296–2302.

Tang, C. Choi, S. and Ma, C. 2007. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry, *International Journal of Biological Macromolecules*, 40: 96–104.

Van de Lagemaat, J. Manuel Silván, J. Javier Moreno, F. Olano, A. and Dolores del Castillo, M. 2007. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins. *Food Research International*, 40: 153–160.

Van Boekel, M. A. J. S. 2001. Kinetic aspects of the Maillard reaction: *A critical review*. Nahrung, 45: 150-159.

Wang, Q. and Ismail, B. 2012. Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey protein. *International Dairy Journal*, 25: 112-122.

Xu, C.H. Yang, X.Q. Yu, S.J. Qi, J.R. Guo, R. Sun, W.W. Yao, Y.J. and Zhao, M.M. 2010. The effect of glycosylation with dextran chains of differing lengths on the thermal aggregation of β-conglycinin and glycinin, *Food Research International* 43: 2270–2276.

Yadav, M.P. Parris, N. Johnston D.B. Onwulata, C.I and Hicks, K.B. 2010. Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability, *Carbohydrate Polymers*, 81: 476–483.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 453-462

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۶۲-۴۵۳

Physicochemical and functional properties of acid precipitated soy proteins-maltodextrin conjugates

S. Boostani [1], M. Moosavi-nasab [2]*, M. Aminlari [2&3], M. Niakosari[4], GH. R. Mesbahi[5]

Received: 2014.06.11
Accepted: 2014.11.05

Introduction: Soybean is an excellent plant protein source with diverse applications in food systems. Despite numerous commercial applications and rich nutritional properties of soybeans, soy proteins are sensitive to heat and other damaging agents during food processing which can limit their applications in food industries. Maillard reaction includes a series of chemical reactions between the free carbonyl groups of carbohydrates and the un-protonated amino groups of proteins under mild experimental conditions. This is one of the most desirable approaches for applying in food systems, because of the safety of the procedure and the independency of adding extra chemicals. Natural occurring Maillard reaction can be a relatively safe and inexpensive method in order to improve functionalities of food proteins. The production of conjugates haspositive influences on food proteins functionality such as solubility, water holding capacity, emulsion activity and stability, foaming properties, thermal stability, whipping ability, textural and gelation properties and also reduce allergenicity of proteins. Due to the positive characteristics and reasonable price of both soy proteins and maltodextrin in food industries, the aim of current study was to enhance the heat stability and functional properties of soy proteins through glycosylation with maltodextrin. In addition, assessment of changes in protein properties as a function of incubation time were evaluated

Materials and methods: Preparation of purified soy proteins (Acid precipitated soy proteins) was done by a multistage process of washing, centrifugation, dialysis and freeze drying. The resulting powder contained pure soy globulins. Conjugation of acid precipitated soy proteins with maltodextrin was performed according to the method described as follows: protein-polysaccharide at a weight ratio of 1: 3 were dissolved in 0.01 M phosphate buffer, at pH values of 8, and were incubated at ambient temperature for 1 hr. Solutions were frozen at –80°C and then freeze dried. Lyophilized powders were incubated at 60 °C for 1, 3, 5 and 7 days, under 79% of relative humidity provided by saturated KBr. For each treatment an un-conjugated (control) sample was prepared under the same conditions. The formation of protein-polysaccharide conjugates was confirmed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel filtration chromatography (Sephadex G-100 chromatographic system was used to separate the conjugated proteins from the un conjugated samples). Determination of protein denaturation temperature changes were carried out using METTLER TA Q100-DSC thermal analyser.The emulsifying properties of the samples including emulsifying activity and emulsion stability were assessed according to the procedure established by Pearce and Kinsella. Protein solubility was measured by calculating the amount of nitrogen in the supernatant and total nitrogen content of the samples and reported as percentage of protein solubility at pH 3, 5, 7 and 9. Foaming properties of the samples including foaming capacity and foaming stability were determined using calibrated measuring cylinder

Discussion & Results: When the heating duration is increased, wider and heavier molecular weight bands emerge near the top of the running gel of SDS-PAGE, and yet these were not observed in the control. As a result of conjugation, the protein-carbohydrate covalent binding occurs, producing heavier molecular weight species, and thus leading to its accumulation on top of the separating gel. Compared with un-modified soy proteins, the conjugated soy proteins eluted in the void volume of G-100 gel permeation chromatography column, suggesting increase in the size and molecular weight of soy proteins due to the covalent attachment of maltodextrin. According to differential scanning calorimetry (DSC) analysis, thermal stability of soy proteins was remarkably increased by conjugation with maltodextrin and maximum denaturation temperature was observed for the mixture incubated for 7 days. The improved thermal stability is manifested in increase in denaturation temperature of globular proteins, hence conjugation leads to significant improvement of soy proteins stability.

1,4 and 5. Ph.D candidate, Associate professor and Assistant professor Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology and Sea Food Processing Research Group, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2&3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
(*-Corresponding Author Email: aminlari@shirazu.ac.ir)

Increase in thermal stability is the result of inclusion of the hydrophilic carbohydrate moiety to the surface of the proteins. Compared to control sample, the solubility, foaming characteristics and emulsifying properties were significantly improved by increasing incubation time. The protein solubility of conjugate remarkably increased at all pH's compared with the un-conjugated proteins. Covalent links between hydrophilic maltodextrin and soy proteins could enhance the reaction tendency between proteins and water molecules under unfavorable conditions. Improvements in the emulsifying properties of the conjugated samples can be explained by the fact that there is a combination among the emulsifying activity of proteins and the stabilizing impacts of polysaccharides per molecule. Foaming capacity of proteins can be affected by the solubility of proteins. Furthermore, maltodextrin is a hydrophilic carbohydrate which can improve the stability of soy proteins foams by acting as a thickener, thus increasing the strength of bubbles. It should also be considered that functionality of proteins are frequently influenced by protein solubility, and this could also serve the understanding of why improvements occur in functional properties of conjugated proteins, compared to un-conjugated ones. The results indicate that physiochemical and functional properties of soy proteins were modified and improved by conjugation with maltodextrin.

Keywords: Conjugate, Functional properties, Heat stability, Soy proteins

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 463-476

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۷۶-۴۶۳

مقایسه‌ی ویژگی‌های کاربردی پروتئین‌های جدا شده از عضله‌ی تیره‌ی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با استفاده ازفرآیندهای تغییر pH اسیدی و قلیایی

نرجس دماوندی کمالی[۱]، امیررضا شویکلو[۲]، علی معتمدزادگان[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۳

چکیده

در این پژوهش، برای استخراج پروتئین از عضله‌ی تیره‌ی ماهی تون زرد باله (*Thunnusalbacares*) به روش تغییر pH، از سه تیمار اسیدی با pH ۳/۵، ۳، ۲/۵ و سه تیمار بازی با pH ۱۱/۵، ۱۱، ۱۰/۵ استفاده شد. سپس اثر این تیمارها بر میزان بازدهی پروتئین، اکسایش و ویژگی‌های کاربردی پروتئین‌ها بررسی گردید. برطبق نتایج بدست آمده بیش از ۸۰٪ پروتئین‌ها بازیافت شدند. در بین دو گروه تیمار مورد بررسی بیش‌ترین بازیافت پروتئین‌ها مربوط به تیمارهای قلیایی بود. در این فرآیندها چربی بیش از ۷۰٪ کاهش یافت که این میزان در تیمارهای قلیایی بالاتر بود. بنابراین میزان اکسایش در نمونه‌ها نیز پایین بوده است. در بین تیمارها، تیمار اسیدی با pH ۳/۵ بیشترین ظرفیت نگهداری آب و تیمار قلیایی با pH ۱۱ بیشترین ویسکوزیته را دارا بودند. با توجه به نتایج قدرت ژلی و شاخص‌های بافتی، پروتئین‌های بدستآمده از عضله‌ی تیره، احتمالا به دلیل تغییر ماهیت پروتئین‌ها هنگام جابه‌جایی، نگهداری و فرآوری ماهی تون، ژل مطلوبی تولید نکردند. بر اساس تشکیل باندهای پروتئینی در الکتروفورز شاید بتوان نتیجه گرفت که پایداری پروتئین‌ها هنگام بالا رفتن pH مناسب بوده است. این پژوهش امکان استفاده از ایزوله‌ی پروتئین تون در فرمولاسیون مواد خوراکی مختلف، جایی که نیاز به قدرت ژلی بالا نیست، را مورد تاکید قرار داد و این مهم می‌تواند ضمن افزایش بهره وری موجب ایجاد ارزش افزوده در صنعت فرآوری آبزیان شود.

واژه های کلیدی: ایزوله‌ی پروتئین ماهی، تون زرد باله، عضله‌ی تیره، تغییر pH

مقدمه

با افزایش آگاهی و پیشرفت علوم و نیز افزایش نیاز به تامین منابع جدید پروتئینی در جهان، تلاش‌های بسیاری برای بهره‌برداری از منابع آبزی شامل گونه‌های کم‌ارزش آبزیان و یا ماهیان ریز و نیز باقی‌مانده‌ی حاصل از فرآورش آبزیان (پسماند یا ضایعات آبزیان)، صورت گرفته است (Nolsøe & Undeland, 2009). استفاده از پروتئین‌های بازیافت‌شده‌ی ماهی به‌عنوان افزودنی‌های کاربردی در فرمولاسیون مواد خوراکی، روش مناسبی برای ایجاد ارزش افزوده، بالا بردن بهره‌وری (Aspmo *et al*, 2005; Ovissipour *et al*, 2009) و افزایش سرانه‌ی مصرف ماهی می‌باشد (Shaviklo, 2008). تون ماهیان یکی از با ارزش‌ترین ماهیان صنعتی در جهان محسوب می‌شوند که رقم قابل توجهی از صید سالانه را به خود اختصاص می‌دهند. یکی از مهمترین گونه‌های تون‌ماهیان، ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) است. بر اساس آخرین آمار رسمی سازمان شیلات ایران، درسال ۱۳۹۲ از حدود ۲۵۰ هزارتن صید تون ماهیان رقمی معادل ۴۵ هزار تن مربوط به ماهی تون زردباله بوده است (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۳) که بخش عمده‌ای از آن به مصرف تولید کنسرو ماهی رسیده است. عضلات ماهی شامل عضله‌ی تیره و روشن می‌باشد، عضله‌ی تیره شامل نواری از بافت‌های تیره است که در زیر پوست در سراسر بدن کشیده شده است. در ماهی تون، عضله‌ی تیره نزدیک استخوان پشتی نیز وجود دارد. هر چند که بطور معمول نسبت بین عضله‌ی تیره و روشن بسته به فعالیت ماهی متفاوت است، ماهیان چرب حجم عضله‌ی تیره بالاتری دارند مثلا در تون زرد باله به ۴۸٪ هم می‌رسد (Sánchez-Zapata & Pérez-Alvarez, 2007).

باقی‌مانده‌ی مواد خام حاصل از کنسروسازی تون ماهیان حدود۶۰-۵۰ ٪ برآورد می شود که از این مقدار ۲۰-۱۰٪ مربوط به

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات و ترویج کشاورزی، کرج.
۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
(* - نویسنده مسئول: Email: shaviklo@gmail.com)

عضله‌ی تیره است که در کنسروسازی از گوشت روشن جدا شده و همراه با دیگر بخش‌های جدا شده از ماهی (مانند سر و احشا) به‌عنوان ضایعات در اختیار واحدهای فرآوری پودر ماهی قرار می‌گیرد (رضوی شیرازی، ۱۳۸۰). ترکیبات شیمیایی متفاوتی در این دو نوع عضله وجود دارد، اما مهمترین آنها حجم بالاتر چربی و رنگدانه‌های هِم[1]موجود در عضله‌ی تیره می‌باشد.

برای بازیافت پروتئین‌ها از روش‌های مختلفی می‌توان استفاده کرد که روش تغییر pH[2] یکی از آن‌هاست (Batista, 1999). پروتئین استخراجی با این روش ایزوله‌ی پروتئین ماهی[3] نامیده می‌شود. ایزوله‌ی پروتئین ماهی بطور مستقیم مورد استفاده قرار نمی‌گیرد بلکه به‌عنوان یک ماده خام در صنایع غذایی و تولید فرآورده‌های با ارزش افزوده بکار می‌رود (Shaviklo *etal*, 2012). استفاده از ایزوله‌ی پروتئین ماهی برای غنی‌سازی فیله‌ی ماهی، افزایش قوام لعاب فرآورده‌های سوخاری و کمک به کاهش جذب روغن در فرآورده‌های سرخ شده و نیز ساخت فرآورده‌های فرموله‌شده‌ی آماده‌ی مصرف گزارش شده است (Shaviklo, 2008).

استفاده از اسید و قلیا برای بازیافت پروتئین‌ها سه مزیت اصلی دارد:

۱- عضلات بطور مکانیکی از استخوان یا پوست جدا نشده و مواد خام خرد شده یا چرخ شده می‌تواند بطور مستقیم در معرض اسید یا قلیا قرار گیرندو بر اساس چگالی متفاوت مواد در طی سانتریفوژ جدا شوند.

۲- پروتئین‌های سارکوپلاسمی بازیافت شده، ضمن بهبود ویژگی‌های کاربردی پروتئین‌های استخراج شده، موجب افزایش بازده می‌شوند.

۳- حذف حداکثری لیپیدها؛ که در این صورت خطر اکسایش چربی‌ها را به ویژه در طول انبارش به حداقل می‌رساند (Nolsøe & Undeland, 2009).

Hultin و همکاران (۲۰۰۵)، فرآیند استفاده از اسید وقلیا و روش سنتی برپایه‌ی شستشو (تولید سوریمی[4]) را با هم مقایسه کردند و با ارزیابی شاخص‌هایی مانند کارایی پروتئین‌ها، توانایی تولید ژل، رنگ و پایداری در برابر اکسایش لیپیدها نتیجه‌گیری کردند که ایزوله پروتئین ماهی و سوریمی شباهت‌های بسیاری با هم داشته و حتی در شرایطی ایزوله پروتئین ماهی بر سوریمی برتری دارد. بر این اساس امروزه استفاده از پروتئین ایزوله شده ماهی رو به گسترش است (Shaviklo *et al*, 2012). ویژگی‌های کیفی ایزوله پروتئین ماهی بستگی به فرآیندهای مورد استفاده (اسیدی یا قلیایی)، گونه‌ی ماهی و نوع مواد خام دارد (Shaviklo, 2008). بر اساس پژوهشی از Hultin و Kristinsson (۲۰۰۳)، تیمار قلیایی پروتئین عضله‌ی کاد (*Gadus morhua*) باعث بهبود ویژگی‌های کاربردی (امولسیون‌کنندگی و قدرت ژلی) پروتئین‌های میوفیبریلی و میوزین شده است.

از هدف‌های اصلی این پژوهش بررسی امکان استخراج پروتئین از باقی‌مانده‌ی حاصل از فرآورش تون زرد باله (عضله‌ی تیره) و تعیین ویژگی‌های کیفی آن است. هرچند انجام موفقیت‌آمیز این پروژه و تولید فرآورده‌ای با ارزش افزوده موجب افزایش بهره‌وری در صنایع شیلاتی کشور خواهد شد.

مواد و روش

گوشت تیره‌ی منجمد شده‌ی تون زرد باله (*Thunnusalbacares*) (۱۰ کیلوگرم) از شرکت کنسروسازی آذین مهر خزر (بابلسر، مازندران) تهیه و در جعبه‌های عایق به آزمایشگاه مرکزی واقع در دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس (نور، مازندران) منتقل شد. در طول مدت انجام آزمایش‌ها، عضله‌ی تیره در سردخانه آزمایشگاه (دمای ۲۰°C-) نگهداری شد.

طراحی تیمارها بر اساس پژوهش‌های پیشین (Davenport & Kristinsson, 2011; Nolsoe & Undeland, 2009; Kristinsson *et al*, 2005) بود. از این‌رو سه تیمار اسیدی با pH ۳/۵، ۳، ۲/۵و سه تیمار بازی با pH ۱۱/۵، ۱۱، ۱۰/۵ انتخاب شدند. در این پژوهش برای تنظیم pHهای مختلف تیمارهای اسیدی و قلیایی از اسید کلریدریک ۱ مولار و سود ۱ مولار استفاده شد. در ابتدا عضله‌ی تیره‌ی ماهی تون زردباله با استفاده از چرخ گوشت (saya, Promeat, W1800, 5mm) بخوبی چرخ شده و سپس گوشت چرخ شده‌ی ماهی با ۹ قسمت آب مقطر سرد، مخلوط (Hultin *et al*, 2005) و با استفاده از همزن مکانیکی (IKA,RW 20 digital, speed 50/ min, 1 min) همگن گردید. سپس با استفاده از محلول‌های یاد شده، pH مخلوط به ۳/۵، ۳، ۲/۵و ۱۱/۵، ۱۱، ۱۰/۵ رسانده شد (Hultin & Kelleher, 2000). در مرحله‌ی بعد، بمنظور جداسازی مواد نامحلول از مواد حل شده از سانتریفوژ آزمایشگاهی (Hermle Labortechnik GmbH, Z36HK, Germany, 8000×g, 25 min) استفاده شد (Park & Thawornchinsombut, 2006). پس از سانتریفوژ کردن نمونه‌ها، ۳ فاز تشکیل گردید. یک لایه در پایین شامل ناخالصی‌ها، یک لایه‌ی ژل مانند در بالا که مجموعه‌یی از لیپیدها و یک لایه در وسط که شامل پروتئین‌های محلول بود. در مرحله‌ی بعد، pH محلول جدا شده با استفاده از اسید یا قلیا به pH ایزوالکتریک[5] رسانده شد (۵/۵) که به موجب آن پروتئین‌های سارکوپلاسمی و میوفیبریلی رسوب کردند. در

1 Heme
2pH-shift
3 Fish protein isolate (FPI)
4 Surimi
5Isoelectric

مرحله‌ی پایانی، پروتئین‌های رسوب کرده توسط سانتریفوژ (۲۰ min، ۴۰۰۰ ×g) جدا شده و رطوبت ایزوله‌پروتئین با فشردن دستی در پارچه صافی کاهش داده شد (۷۲-۷۰٪). در این مرحله دقت شد که رطوبت پروتئین‌های آبگیری شده یکسان باشند. پروتئین‌های استخراج شده به روش اسیدی و قلیایی در کیسه‌های زیپ‌دار در فریزر (دمای ۱۸°C-) نگهداری شده و آزمون‌ها ظرف یک هفته بر روی آنها انجام شد. اندازه گیری مقادیر پروتئین با استفاده از دستگاه کلدال، چربی با استفاده از دستگاه سوکسله، رطوبت با آون و خاکستر با کوره طبق روش AOAC (۱۹۹۵) بر روی عضله‌ی تیره و پروتئین استخراج شده انجام شد. اندازه گیری تیوباربیتوریک اسید[1] به روش رنگ‌سنجی صورت گرفت. مقدار (TBA میلی‌گرم مالون آلدئید در کیلوگرم) بر اساس رابطه روبرو محاسبه گردید (Natseba *et al*, 2005).

$$TBA = \frac{(As-Ab)\times 50}{200} \quad (۱)$$

As: مقدار جذب نمونه در ۵۳۰ نانومتر

Ab: مقدار جذب شاهد (آب مقطر)

آماده‌سازی ژل شامل ۴ مرحله‌ی خرد کردن، پرکردن، حرارت‌دهی و سردسازی بود. به این صورت که نمونه‌های ایزوله پروتئین حاصل از هر تیمار با ۳٪ وزنی نمک مخلوط و با آسیاب برقی (Vidas.VI-905) بخوبی همگن شدند. سپس با فشار زیاد و به صورت متراکم با استفاده از قیف (قیف قنادی به شکل سرنگ) وارد روکش (روکش سوسیس از نوع پلی اتیلنی به قطر ۱۵ mm) شدند. در این مرحله دقت شد که حباب هوا در نمونه و روکش ایجاد نشود. دو سر روکش را با نخ، محکم بسته و به مدت ۱ ساعت در یخچال قرار گرفت. سپس در دمای ۹۰°C-۸۵ به مدت ۳۰ min در بن‌ماری حرارت داده شد. پس از حرارت‌دهی، نمونه‌های ایزوله پروتئین روکش شده در مخلوط آب و یخ خنک و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. سپس به قطعاتی به طول۱۵ mm برش داده شد و آزمون‌های مربوط انجام گردید. به‌منظور انجام آزمون نفوذ[2] (Brookfield, USA) از میله سر کروی به قطر ۵ mm، از جنس فولاد زنگ‌نزن و سرعت نفوذ ۶۰mm/minute استفاده شد (FAO/WHO, 2005). میزان نیروی شکست بر حسب گرم و فاصله‌ی شکست بر حسب سانتی‌متر در این آزمایش تعیین شده و استحکام ژل[3] بر مبنای این دو پارامتر محاسبه گردید.

(۲) استحکام ژل =نیروی شکست[4] (g)× شکست فاصله(cm)

آنالیز پروفایل بافت[5] با پروب آلومینیومی (Brookfield, USA) به قطر ۵۰ mm و نیروی وارده به میزان ۲۵ kg و سرعت ۱ mm/s انجام شد (FAO/WHO, 2005). برای محاسبه‌ی شاخص‌های مرتبط با این آزمون، هر نمونه ۲ بار فشرده و سختی (نیروی بیشینه طی اولین چرخه فشردن)، الاستیسیته (ارتفاعی که نمونه در بازه زمانی بین انتهای گاز زدن اول و شروع گاز زدن دوم به آن باز می‌گردد)، چسبندگی (ناحیه نیروی منفی حاصل از گاز زدن اول که بیانگر کار لازم جهت کشیدن پروب دستگاه به عقب از داخل نمونه می‌باشد) و بهم پیوستگی (نسبت مساحت سطح۲ به سطح ۱) ژل سنجیده شد.

بمنظور ارزیابی رنگ، با دستگاه رنگ‌سنج (Micromatch plus,sheen, ASTM 2244)، نمونه‌ها به ضخامت ۱۵ mm برش داده شده و شاخص‌های رنگی نمونه‌ها شامل L* (میزان روشنایی)، a* (میزان تمایل به رنگ قرمز) و b* (میزان تمایل به رنگ زرد) اندازه‌گیری شد. میزان سفیدی نمونه‌ها (Whiteness) طبق رابطه زیر مشخص گردید (FAO/WHO, 2005).

$$Whiteness=100-\sqrt{(100-L*)^2 + a*^2 + b*^2} \quad (۳)$$

بمنظور اندازه‌گیری قدرت ژلی به روش حسی (Park, 2004) از آزمون تا کردن با دست[6] و گاز زدن با دندانهای جلو[7] که یکی از ساده‌ترین راه‌ها برای سنجش قدرت ژلی است، استفاده شد. آزمون تا کردن با برشی از نمونه ژل به ضخامت ۵ mm که بین دو انگشت اشاره و شست به آرامی روی هم تا شدند، انجام شد. آزمون‌ها توسط سه نفر فرد آموزش دیده انجام و امتیازبندی بر پایه‌ی جدول (۱) صورت گرفت.

جدول ۱- امتیازبندی در آزمون تا کردن

امتیاز	نوع خصوصیت
۵	اگر دو بار روی هم تا شود، ترک نمی‌خورد
۴	یک بار تا شود ترک نمی‌خورد ولی اگر دو بار تا شود ترک ایجاد می‌شود
۳	یک بار تا شود ترک نمی‌خورد اما اگر دو بار تا شود دو نیم می‌شود
۲	یک بار تا شود ترک ایجاد می‌شود
۱	یک بار تا شود به دو نیم تقسیم می‌شود

(FAO/WHO, 2005)

آزمون گاز زدن هم (توسط سه نفر فرد آموزش دیده) با برشی از نمونه ژل به ضخامت ۵ mm و با دندان‌های جلو انجام گرفت و میزان ارتجاعیت و الاستیسیته مشخص گردید. امتیاز بندی بر طبق جدول (۲) انجام شد.

بمنظور سنجش ویسکوزیته، نمونه‌های پروتئین به نسبت ۱:۵ با آب مقطر و با استفاده از هموژنایزر (WIGGEN HAUSER,D-500,Germany, speed 10000/min, 1 min)، همگن شدند.

سپس ۱۵ میلی‌لیتر از مخلوط همگن شده را وارد سیلندر

1 Thiobarbituric acid (TBA)
2Puncture test
3Gel strength
4breaking force
5Textrure Profile Analysis (TPA)
6FoldingTest
7BitingTest

ویسکومتر کرده (نوع پروب Spindle S-31) و ویسکوزیته با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد (Brookfield,DV-II+Pro,U.S.A) در دمای ۵°C با سرعت چرخش ۱۰۰ rpmبه مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد (Kristinsson *etal*, 2005). در طول اندازه‌گیری با کمک یخ دمای حمام آب ویسکومتر در ۵°C ثابت نگه‌داشته شد. آزمون ظرفیت نگهداری آب با استفاده از سانتریفوژ (AOAC, 1995) انجام شد. به این صورت که ۲-۱ گرم از نمونه در کاغذ صافی پیچیده و با دور ۱۳۵۰rpm در دمای ۵°C به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (Hermle Labortechnik GmbH, Z36HK,Germany) شد. تفاوت وزن نمونه قبل و بعد از سانتریفوژ محاسبه گردید و ظرفیت نگهداری آب طبق رابطه زیر بدست آمد.

$$WHC = \frac{Wwet - Wdry}{Wdry} \times 100 \qquad (۴)$$

Wwet: وزن نمونه قبل از سانتریفوژ به گرم

Wdry: وزن نمونه بعد از سانتریفوژ به گرم

جدول ۲- امتیازبندی در آزمون گاز زدن

کیفیت ژل	امتیاز
فوق‌العاده سخت	۱۰
خیلی سخت	۹
سخت	۸
کمی سخت	۷
نسبتا خوب	۶
کمی ضعیف	۵
ضعیف	۴
خیلی ضعیف	۳
فوق‌العاده ضعیف	۲
ناتوان در تشکیل ژل	۱

(FAO/WHO, 2005)

پروتئین‌های بدست آمده از تیمارهای اسیدی و قلیایی به روش الکتروفورز عمودی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. الکتروفورز ژل سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریلامید[1]، به روش Laemelli (۱۹۷۰) انجام شد. نمونه‌ی پروتئین پس از آماده‌سازی به مقدار ۱۵µL در ژل مورد نظر بارگذاری شد. ژل پس از رنگ آمیزی، عکس‌برداری شده و باندهای تشکیل شده بررسی شدند. وزن مولکولی استاندارد به کار برده شده ۱۱۶-۱۴/۴ kDa بود. دراین روش از تفاوت وزن مولکولی و بارالکتریکی پروتئین‌ها بطور همزمان برای تفکیک آنها از یکدیگر استفاده شد. مقادیر دناتوره شدن پروتئین‌ها، مقادیر اکتین و میوزین و توالی پروتئین‌ها با استفاده از این روش مشخص گردید (Kristinsson *et al*, 2005).

1Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

برای تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ (Chicago, IL, U.S.A.windows, SPSS Inc.,SPSS 16.0 for) استفاده شد. جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه[2] استفاده گردید. برای مقایسه میانگین‌ها در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار بود از آزمون دانکن استفاده شد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل تمام اختلاف‌ها در سطح (p<۰/۰۵) معنی‌داری در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه‌ی تقریبی عضله‌ی تیره‌ی تون زرد باله و پروتئین‌های استخراج شده‌ی حاصل از تیمارهای اسیدی و قلیایی در جدول‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳- تجزیه‌ی تقریبی عضله‌ی تیره‌ی تون زرد باله

رطوبت (٪)	پروتئین ماده خشک (٪)	چربی ماده خشک (٪)	خاکستر ماده خشک (٪)
۷۱/۱۳±۰/۰۸	۸۳/۷۹±۱/۲۵	۳/۸۳±۰/۲۲	۵/۰۵±۰/۰۷

داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شده‌اند.

جدول ٤- تجزیه‌ی تقریبی پروتئین بازیافتی حاصل از تیمارهای اسیدی و قلیایی

تیمار(pH)	رطوبت (٪)	پروتئین (خشک) (٪)	چربی (خشک) (٪)
۲/۵	۷۶/۰۰±۰.۵۶^{a}	۷۰/۰±۰/۰^{c}	۴/۲۲ ±۰/۳۸^{c}
۳	۷۵/۵۰±۱.۵۵^{a}	۷۰/۰±۰/۰^{c}	۳/۶۲ ±۰/۲۴^{c}
۳/۵	۷۱/۶۶±۰/۵۱^{bc}	۷۴/۰±۰/۰^{a}	۸/۲۱ ±۰/۲۶^{a}
۱۰/۵	۷۰/۵۰±۰/۹۸^{c}	۷۴/۰±۰/۰^{a}	۶/۴۲ ±۰/۷۴^{b}
۱۱	۷۰/۶۰±۰/۱۴^{c}	۷۲/۰±۰/۰^{b}	۱/۷۹ ±۰/۲۹^{d}
۱۱/۵	۷۲/۶۱±۰/۸۲^{b}	۷۰/۰±۰/۰^{c}	۴/۳۰ ±۱/۶۹^{c}

داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شده‌اند.

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح (p<۰/۰۵) می‌باشد.

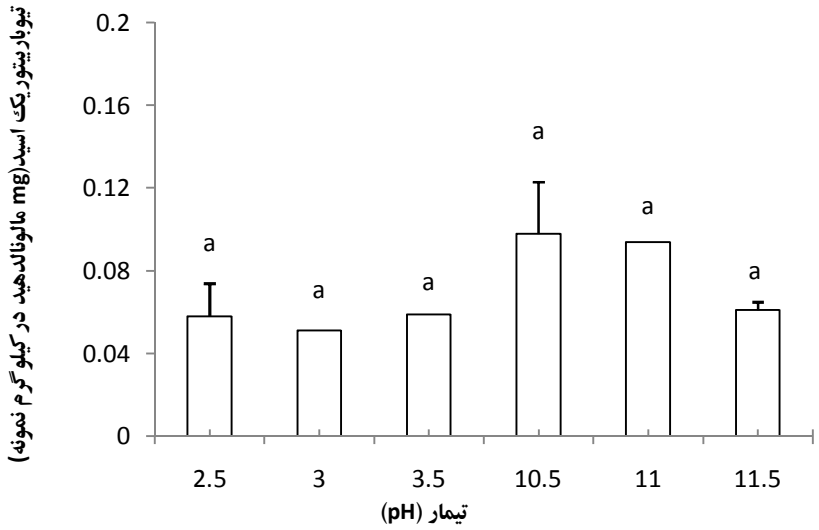
بطور متوسط رطوبت پروتئین‌های بازیافتی ۷۲٪ بود. کمترین مقدار رطوبت (۷۰٪) در تیمارهای قلیایی با pH ۱۰/۵ و ۱۱ دیده شد. مقدار چربی در تیمارهای اسیدی با pH ۲/۵، ۳ و تیمار قلیایی با pH ۱۱/۵ یکسان بود (p>۰/۰۵). تیمارهای اسیدی ۳/۵ و قلیایی ۱۰/۵، بیشترین مقدار چربی را دارا بودند که با هم و با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند. متوسط وزن خشک پروتئین حدود ۷۱٪ بود و تیمارهای ۳/۵ و۱۰/۵، مقدار پروتئین بیشتری داشتند (۷۴٪) که اختلاف آن با دیگر تیمارها معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

در شکل (۱) میزان تیوباربیتوریک اسید پروتئین حاصل از

2 One way ANOVA

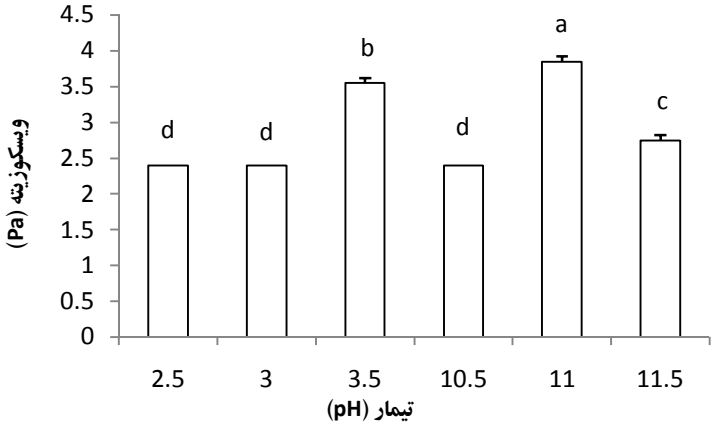
تیمارهای اسیدی و قلیایی نشان داده شده است.

بر طبق نمودار مقادیر شاخص TBA، شاخص اکسایش ثانویه، بطور کلی پایین و این میزان در تیمارهای اسیدی بطور معنی‌داری کمتر از تیمارهای قلیایی با pH ۱۰/۵ و ۱۱ و برابر با تیمار ۱۱/۵ بود. تیمارهای قلیایی با pH ۱۰/۵ و ۱۱ بیشترین مقدار اکسایش و با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵). نتایج حاصل از اندازه‌گیری ویسکوزیته پروتئین استخراج شده از تیمارهای اسیدی و قلیایی در شکل (۲) نشان داده شده است.



شکل ۱- مقادیر تیوباربیتوریک اسید تیمارهای مختلف pH (mg مالون‌آلدهید در kg نمونه)

حروف نشان‌دهنده نداشتن اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح p>۰/۰۵ می‌باشد.



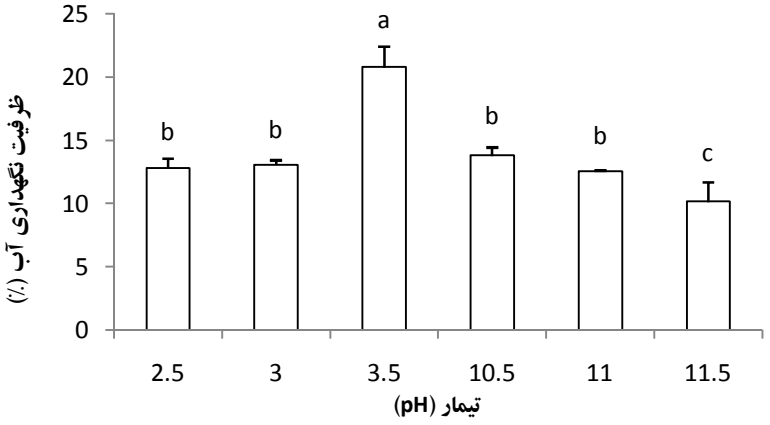
شکل ۲- مقادیر ویسکوزیته پروتئین بدست آمده از تیمارهای مختلف pH

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

در بین تیمارها، تیمار قلیایی ۱۱ بیشترین ویسکوزیته را داشت. تیمارهای اسیدی با pH ۲/۵ و۳ و تیمار قلیایی ۱۰/۵ ویسکوزیته کمتر و مشابه داشتند و اختلاف آنها با دیگر تیمارها معنی‌دار بود. تیمارهای ۳/۵ و ۱۱/۵ نیز با هم و با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵).

در شکل ۳ مقادیر حاصل از اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری آب

پروتئین استخراج شده از تیمارهای مورد آزمایش نشان داده شده است. بطور کلی تفاوت چشمگیری بین تیمارهای اسیدی و قلیایی از نظر ظرفیت نگهداری آب دیده شد. تیمار اسیدی با pH ۳/۵ بیشترین ظرفیت نگهداری آب و با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵).



شکل ۳- مقادیر ظرفیت نگهداری آب پروتئین حاصل از تیمارهای اسیدی و قلیایی

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج مربوط به سنجش شاخص‌های رنگی و سفیدی بر روی عضله‌ی تیره‌ی تون زرد باله و همینطور بر روی ژل پروتئین حاصل از تیمارهای اسیدی و قلیایی در جدول ۵ نشان داده شده است. همانطور که از جدول پیداست به دلیل تیره رنگ بودن نمونه اولیه، مقادیر شاخص‌های روشنایی و سفیدی پایین بوده و طبیعی است که شاخص‌های قرمزی و زردی مقادیر بیش‌تری داشته باشند.

جدول ۵- مقادیر شاخص‌های رنگی و تعیین سفیدی عضله‌ی تیره‌ی تون زرد باله و ژل پروتئینی حاصل از تیمارهای مختلف pH

	pH	L*	a*	b*	Whiteness
تیمار اسیدی	۲/۵	۳۳/۴۷±۰/۸۳^{a}	۴/۱۸±۰/۴۴^{ab}	۱۳/۵۰±۱/۸۰^{a}	۳۱/۹۶ ±۰/۴۷^{a}
	۳	۳۰/۶۳±۰/۰۹^{b}	۴/۶۷±۰/۰۹^{a}	۱۲/۹۵±۰/۵۹^{a}	۲۹/۲۷±۰/۰۰^{b}
	۳/۵	۲۷/۷۹±۱/۹۱^{c}	۴/۱۷±۰/۶۰^{ab}	۵/۲۴±۲/۰۵^{b}	۲۷/۴۶±۱/۷۹^{c}
تیمار قلیایی	۱۰/۵	۳۲/۶۶±۰/۷۴^{a}	۳/۳۷±۰/۱۸^{c}	۱۳/۹±۰/۲۸^{a}	۳۱/۱۶±۰/۶۷^{a}
	۱۱	۳۲/۷۲±۰/۶۰^{a}	۴/۰۵±۰/۶۳^{b}	۱۳/۷۳±۰/۰۱^{a}	۳۱/۲۱±۰/۵۶^{a}
	۱۱/۵	۲۹/۸۲±۰/۵۳^{b}	۳/۳۷±۰/۲۰^{c}	۶/۰۹±۰/۰۱^{b}	۲۹/۴۷±۰/۵۲^{b}
	عضله‌ی تیره	۲۶/۳۵±۰/۲۹	۴/۶۸±۰/۱۲	۳/۹۳±۰/۵۰	۲۶/۰۹±۰/۳۳

داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شده‌اند.

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

برای شناسایی اختلاف در وضعیت پروتئینی ایزوله‌های پروتئین تون از SDS-PAGE استفاده شد و نمونه یا نوار استاندارد با نشانگرهای وزن مولکولی برای تعیین حضور پروتئین‌های مختلف یا عدم حضور آن‌ها به کار برده شد. همانطور که در شکل ۴ دیده می‌شود پروتئین‌های شناسایی شده در pHهای مختلف عبارتند از: α- اکتینین[1]، اکتین[2]، دسمین[3]، تروپومیوزین[4]. با مقایسه باندهای حاصل در SDS-PAGE مشاهده شد که باندهای اصلی پروتئین در نمونه‌ها وجود دارند.

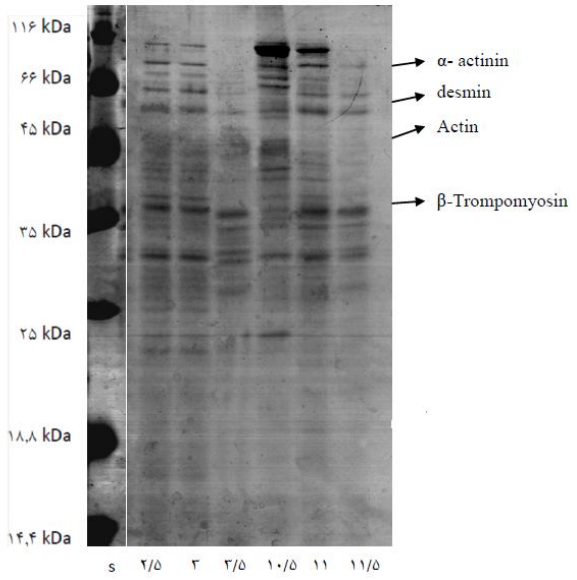
سنجش بافت نمونه‌ها حاکی از آن است که پروتئین ایزوله‌ی تون از چسبندگی[5]، بهم‌پیوستگی[1] و ارتجاعیت[2] پایینی برخوردار هستند.

1 α-actinin
2Actin
3Desmin
4Trompomyosin
5Adhesiveness

جدول۶ مقادیر حاصل ازآنالیز پروفایل بافت را در تیمارهای مختلف، نشان می‌دهد.

مقادیر حاصل از آزمون نفوذ تیمارهای مختلف، در جدول۷ نشان داده شده است. تفاوت آماری معنی‌دار در قدرت ژلی نمونه‌های فرآوری شده‌ی ایزوله پروتئین ماهی در pHهای مختلف دیده شد($p<۰/۰۵$). با افزایش pH مقدار قدرت ژلی نیز افزایش یافت. در نتیجه کم‌ترین قدرت ژلی مربوط به تیمار با pH ۲/۵ و بیش‌ترین مقدار مربوط به تیمار با pH ۱۱/۵ بود.

نتایج آزمون‌های تا کردن و گاز زدن با نتایج ارزیابی قدرت ژلی ایزوله‌ها در جدول ۷ مقایسه شده است.



شکل ٤- سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)، ژل ۲۰-٤٪ و ۱۵µL بارگذاری، پروتئین‌های رسوب کرده حاصل از تیمارهای مختلف pH در مرحله دوم سانتریفوژ، (s) مشخص‌کننده نوار استاندارد (۱۱٦-۱٤/٤ کیلو دالتون) و اعداد نشان‌دهنده تیمار مورد استفاده

امتیاز ۱، کم‌ترین امتیاز در آزمون تا کردن می‌باشد و به این معناست که ژل مورد نظر با یک بار تا کردن دو نیم می‌شود و در امتیاز ۲ ترک برمی‌دارد. در واقع نمونه‌های ژل تولید شده قابلیت تا شدن نداشتند. با این حال نمونه‌های قلیایی امتیازهای بهتری دریافت کردند. در آزمون گاز زدن نمونه حاصل از تیمار قلیایی با pH ۱۱ امتیاز نسبتاً خوب را بدست آورده است و نمونه‌های دیگر از امتیاز ۵ (کمی ضعیف) تا امتیاز ۲ (فوق العاده ضعیف) را به خود اختصاص دادند. در بین تیمارها، تیمار اسیدی با pH ۲/۵ کمترین قابلیت را در آزمون گاز زدن داشت. از نتایج آزمون‌های حسی پیداست که پروتئین بازیافتی از عضله‌ی تیره قابلیت تشکیل ژل پایینی داشت.

عوامل زیادی مانند فصل صید، محیط زندگی، سن و مراحل فیزیولوژیکی، در مقدار تجزیه‌ی تقریبی آبزیان مؤثر هستند. از این رو مقایسه ترکیبات عضلات ماهیان مختلف مشکل است. با این حال آزمون‌های انجام شده حاکی از آن است که تجزیه‌ی تقریبی عضله‌ی تیره‌ی ماهی تون زردباله با دیگر ماهیان تون، مانند ماهی بونیتو (*Sarda sarda*) (Emin-Erdem *et al*, 2009) و همینطور *Thunnus orientalis* (Nakamura *et al,* 2007) یکسان می‌باشد.

هیچ گزارش منتشر شده‌ایی در خصوص تجزیه‌ی تقریبی ایزوله‌ی پروتئین ماهی تون زردباله برای مقایسه با نتایج این پژوهش یافت نشد. مقدار رطوبت در ایزوله‌ی پروتئین ماهی بستگی به روش رطوبت‌گیری و تنظیم آن دارد. با این حال وجود گروه‌های فعال در ساختار پروتئین‌ها باعث جذب و نگهداری بیشتر آب می‌شود (موسوی‌نسب و همکاران، ۱۳۹۰). کاهش چربی‌ها نیز به دلیل حذف آنها در پایان سانتریفوژ مرحله‌ی نخست است. شکسته شدن چربی‌ها و انحلال بیشتر آن در آب می‌تواند دلیلی بر کاهش جداسازی چربی‌ها با استفاده از روش اسیدی در مقایسه با روش بازی باشد (Shaviklo, 2007؛ موسوی نسب و همکاران، ۱۳۹۰).

Undeland و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه بر روی ماهی هرینگ، به این نتیجه رسیدند که نمونه‌های پروتئین ایزوله شده‌ی ماهی که به روش قلیایی تهیه شده بودند نسبت به نمونه‌های ایزوله به روش اسیدی، دارای میزان چربی کم‌تری بودند.

کاهش بیشتر لیپیدها در فرآیندهای اسیدی و قلیایی مورد انتظار است چرا که در pH بالا و پایین، پروتئین‌های حل شده از لیپیدهای ذخیره‌ای و فسفولیپیدهای غشایی جدا و در مرحله‌ی سانتریفوژ این ترکیبات بر اساس تفاوت در دانسیته و قابلیت حل شدن مجزا می‌شوند. بیشتر چربی‌های ذخیره‌ای و اسیدهای چرب اشباع در لایه بالایی وجود دارند، و حال آنکه اگر شرایط مساعد باشد، انتظار می‌رود قسمت اعظم فسفولیپیدهای غشایی غیراشباع در خلال مرحله‌ی نخست سانتریفیوژ دیده شوند (Hultin, 2002). از طرف دیگر کاهش کمتر لیپیدها در فرآیندهای اسیدی و قلیایی تعجب آور نیست چرا که در مرحله‌ی رسوب ایزوالکتریک لیپیدهای غشایی حفظ و قسمتی از لیپیدهای ذخیره‌ای با پروتئین‌ها متراکم می‌شوند (Davenport *et al*, 2004). در مقایسه دو فرآیند، تیمار قلیایی نسبت به تیمار اسیدی در کاهش چربی‌ها موفق‌تر بوده است (Kristinsson *et al*, 2005). در توضیح Kristinsson و Demir (۲۰۰۳) بزرگترین تفاوت بین روش سنتی تولید سوریمی و فرآیندهای اسیدی و قلیایی به سانتریفوژ مرحله‌ی نخست مربوط است. در تحقیق حاضر نیز درصد کاهش چربی‌ها در تیمار قلیایی (۷۶/۳۹٪) بیشتر از تیمار اسیدی (۷۳/۴۴٪) بود. کمترین کاهش چربی در تیمار اسیدی با pH ۳/۵ و تیمار قلیایی با pH ۱۰/۵ بود.

---

1 Cohesiveness
2Resilience

جدول ٦- مقادیر حاصل از آنالیز پروفایل بافت (TPA)

تیمار (pH)	سختی (g)	بهم‌پیوستگی	چسبندگی (mJ)	جهندگی	حالت ارتجاعی
۲/۵	۲۴۶۷±۲/۸۲^{f}	۰/۱۲±۰/۰۰f	۰/۰	۰/۵۰±۰/۰۰^{c}	۰/۰۵±۰/۰۰^{d}
۳	۹۹۳۲±۱/۴۱^{b}	۰/۲۰±۰/۰۰^{d}	۰/۱۵±۰/۰۷	۰/۸۲±۰/۰۱^{b}	۰/۱۲±۰/۰۳^{c}
۳/۵	۳۱۳۰±۰/۷۰^{e}	۰/۱۲±۰/۰۱^{f}	۰/۰	۰/۴۶±۰/۰۲^{d}	۰/۰۷±۰/۰۰^{d}
۱۰/۵	۶۵۸۱±۱/۴۱^{c}	۰/۳۵±۰/۰۱^{c}	۰/۱۵±۰/۰۷	۰/۹۱±۰/۰۱^{a}	۰/۱۲±۰/۰۰^{c}
۱۱	۶۴۹۱±۰/۷۰^{d}	۰/۶۴±۰/۰۰^{a}	۰/۰	۰/۹۱±۰/۰۰^{a}	۰/۳۱±۰/۰۱^{a}
۱۱/۵	۱۰۷۹۳±۱/۴۱^{a}	۰/۵۳±۰/۰۱^{b}	۰/۰	۰/۸۱±۰/۰۱^{b}	۰/۲۰±۰/۰۰^{b}

جدول۷- مقادیر قدرت ژلی (آزمون نفوذ) و امتیازهای داده شده در آزمون‌های تا کردن (۵ تا ۱) و گاز زدن (۱۰ تا ۱) به ژل پروتئینی حاصل از تیمارهای مختلف pH

شاخص	تیمار(pH)					
	۲/۵	۳	۳/۵	۱۰/۵	۱۱	۱۱/۵
قدرت ژلی (g×cm)	۳/۱۷±۰/۱۶$_{f}$	۳۷/۵۱±۰/۴۸$_{e}$	۶۴/۲۲±۰/۳۲$_{d}$	۹۷/۳۶±۰/۳۶$_{c}$	۱۵۶/۶۰±۰/۵۱$_{b}$	۳۲۵/۸۰±۰/۴۳$_{a}$
تا کردن	۱±۰/۰^{b}	۱±۰/۰^{b}	۱±۰/۰^{b}	۲±۰/۰^{a}	۲±۰/۰^{a}	۱±۰/۰^{b}
گاز زدن	۲±۰/۰^{e}	۴/۳۳±۰/۵۷^{c}	۳/۶۶±۰/۵۷^{d}	۴/۶۶±۰/۵۷^{c}	۶±۰/۰^{a}	۵/۶۶±۰/۵۷^{b}

داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

رنگدانه‌ها و اکسایش لیپیدها واکنش‌های اصلی مخرب در گوشت ماهی و فرآورده‌های شیلاتی در طی ذخیره‌سازی و مسئول کاهش معنی‌دار خصوصیات کیفی نظیر رنگ، طعم، بافت و ارزش غذایی هستند (Belitz *et al*, 2009). مقدار میوگلوبین موجود در عضله‌ی تیره‌ی ماهی تون (۹۶۵۰ mg/kg) در مقایسه با دیگر ماهیان دارای عضله‌ی تیره بالا می‌باشد (Sánchez-Zapata *et al*, 2011) به عنوان مثال این مقدار در قباد ۰/۳۹ mg/g و در نیزه ماهی سیاه[1]، ۰/۵۱ mg/g می‌باشد (Sikorski *et al*, 1994). این حجم میوگلوبین، عضله‌ی ماهی تون را مستعد اکسایش لیپیدها می‌کند (Papadopoulos *et al*, 2003). پروتئین‌های "هم" بعنوان کاتالیزورهای عمده یا واسطه‌های اکسایش در عضلات ماهیان هستند (Kristinsson *et al*, 2005). در هنگام اکسایش چربی در نتیجه‌ی تجزیه اسیدهای چرب چند غیراشباعی، مالون آلدهید (شاخص اکسایش ثانویه) تشکیل می‌شود که ناشی از وجود مواد واکنش دهنده با ترکیبات حاصل از مرحله دوم اتواکسیداسیون است. طی آن پراکسیدها به موادی چون آلدهیدها و کتون‌ها تبدیل می‌شوند (Lindasy, 1991). در تحقیق حاضر بمنظور بررسی میزان اکسایش ثانویه بعد از اعمال فرآیندهای اسیدی و قلیایی از شاخص TBA استفاده شد. به گزارش Sánchez-Zapata و همکاران (۲۰۱۱) شاخص TBA در عضله‌ی تیره‌ی تون زردباله (پس از یک ماه نگهداری در ۱۸°C-)، ۱/۲۳ میلی‌گرم مالون آلدهید در کیلوگرم نمونه تعیین شده است. Kristinsson و Demir (۲۰۰۳) در مطالعه‌ای بر روی چندین گونه به این نتیجه رسیدند که اکسایش چربی‌ها در فرآیند اسیدی بطور معنی‌داری نسبت به فرآیند قلیایی بیشتر است.

Kristinsson و همکاران، ۲۰۰۵، گزارش کرده اند که سطوح TBA تشکیل شده بعد از فرآیند تاثیر زیادی در پایداری اکسایشی بعدی ایزوله در طول دوره ذخیره سازی دارد؛ مقادیر بالاتر TBA موجب افزایش سرعت و توسعه اکسایش می‌شود (Petty & Kristinsson, 2004). حضور رنگدانه‌های بیشتر در عضله‌ی تیره موجب تشدید اکسایش می‌شود. در نمونه‌های ایزوله‌ی پروتئین حاصل از عضله‌ی تیره‌ی تون زردباله اکسایش به دلیل کم شدن لیپیدها پایین بوده با این حال در تیمارهای قلیایی با pH ۱۰/۵ و ۱۱ بیشتر از دیگر تیمارها بوده ولی معنی‌دار نبوده است. یکی از اهداف تولید ایزوله‌ی پروتئین، جداسازی پروتئین‌ها از چربی‌های غشایی نامطلوب است (Kristinsson *et al*, 2005). Hultin (۲۰۰۲) گزارش کرده است که ویسکوزیته ۵۰ mPa یا کم‌تر برای خارج کردن چربی‌ها در مرحله‌ی سانتریفوژ (در حالی که پروتئین‌ها محلول باقی می‌مانند) مطلوب است. بنظر می‌رسد افزایش در ویسکوزیته با افزایش و کاهش pH از حالت خنثی در نتیجه بالا رفتن دافعه الکترواستاتیک و ظرفیت هیدرودینامیک پروتئین‌های ماهیچه باشد (Kristinsson *et al*, 2005). افزایش بار پروتئین بعنوان عامل تورم قابل ملاحظه آن در نتیجه نیروی دافعه بین پروتئین‌ها می‌باشد (Kristinsson & Hultin, 2003). اعتقاد بر این است که تورم یا رسوب و به همراه آن

1 Black Marlin

افزایش ویسکوزیته عمدتا به دلیل وجود پروتئین‌های میوفیبریلی در ماهیچه است که بیشتر فضای سلول را اشغال کرده‌اند و به علت مجموعه ساختاری و کشیدگی ساختارها، ظرفیت هیدرودینامیکی بالایی دارند و به این ترتیب موجب افزایش بار می‌شوند (Undeland *et al*, 2002Kristinsson, 2002;).

ظرفیت نگهداری آب یکی از مهمترین شاخص‌های کیفی گوشت و فرآورده‌های شیلاتی می‌باشد چرا که از دست دادن وزن را در طی خرد کردن و ذخیره سازی کاهش می‌دهد و توانایی گوشت را به منظور حفظ آب در طی فرآوری بهبود می‌بخشد (Sánchez-Zapata و همکاران، ۲۰۱۱). به گزارش Sánchez-Zapata و همکاران (۲۰۱۱) ظرفیت نگهداری آب عضله‌ی تیره در حدود ۸/۳۷ گرم آب در گرم نمونه می‌باشد و به این معناست که عضله‌ی تیره مانند عضله‌ی روشن قابلیت استفاده در غذاهای امولسیون شده یا فرآورده‌های پخته شده را دارد چرا که ظرفیت اتصال امولسیون نتیجه دناتوره شدن و کاهش حلالیت پروتئین‌هاست Sánchez-Zapata (*etal*, 2011). پروتئین‌های بافت‌های عضلات ماهیان به طور معمول در سه گروه پروتئین‌های سارکوپلاسمی (۳۰-۲۵٪)، پروتئین‌های میوفیبریلی (۸۰-۷۰٪) و پروتئین‌های استروما از بافت‌های پیوندی (۳٪) جای می‌گیرند (Huss, 1998). عضلات تیره نسبت به عضلات روشن پروتئین‌های سارکوپلاسمی بیشتری دارند (Hultin & Kelleher, 2000). ویژگی‌های کاربردی پروتئین‌ها تحت تاثیر روابط متقابل آب و پروتئین‌هاست و در نهایت وابسته به این است که در یک فرآورده خوراکی چطور یک پروتئین به آب متصل شده و آنرا حفظ می‌کند (Kristinsson & Rasco, 2000). در تولید ایزوله‌ی پروتئین، قابلیت اتصال به آب پروتئین به دلیل حفظ پروتئین‌های سارکوپلاسمی افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر مقادیر ظرفیت نگهداری آب تیمارهای اسیدی و قلیایی نزدیک به هم می‌باشد با این حال دلیل اختلاف معنی‌دار تیمار اسیدی ۳/۵ با دیگر تیمارها را می‌توان به بازیافت بیشتر پروتئین‌های سارکوپلاسمی ربط داد. pH، نوع و مقدار پروتئین و نیز میزان تغییر ماهیت یا دناتوره شدن آنها بر ظرفیت نگهداری آب اثرگذار هستند (Shaviklo, 2008).

رنگ ایزوله‌ی پروتئین ماهی بستگی به نوع ماده‌ی خام اولیه دارد. بنابراین هر چه مقدار رنگدانه‌ها در ماده‌ی خام بیش‌تر باشد فرآورده‌یی تیره‌تر تولید می‌شود (Nolsqe & Undeland, 2009).Onyango و همکاران (۱۹۹۸) مطالعاتی بر روی گوشت راسته[1] جانوران مختلف انجام داده و مقدار میوگلوبین موجود در آنها را مشخص کردند. نتایج این تحقیق مشخص کننده رابطه‌ای بین مقدار میوگلوبین و شاخص روشنایی (L*) می‌باشد ($y= -2.24x + 51.2$ که در آن y برابر با L* و x برابر با حجم میوگلوبین (mg/g)). بر طبق این رابطه حجم میوگلوبین موجود در عضلات تون ۱۴-۳ بار بیشتر از ماهیچه‌های پستانداران است. این نتایج منطبق با تحقیق گزارش شده توسط Kanoh و همکاران (۱۹۸۶) نیز می‌باشد. مقادیر بالای شاخص‌های زردی و قرمزی در ایزوله‌ی پروتئین نمایانگر حضور رنگدانه‌های میوگلوبین و هموگلوبین است (Choi & Park, 2002). بنابراین مقادیر شاخص روشنایی به واسطه این رنگدانه‌ها پایین می‌آید. در حقیقت کاهش شاخص روشنایی مربوط به حضور پروتئین‌های سارکوپلاسمی به نام پروتئین‌های "هم" در ایزوله‌ی پروتئین می‌باشد (Kim *et al*, 2005). با توجه به مطالب بیان شده در تحقیق حاضر نیز روشنایی در همه تیمارها پایین بود. وجود اختلاف‌های معنی‌دار بین تیمارها، می‌تواند مربوط به فروپاشی بیشتر یا کمتر رنگدانه‌ها در تیمارهای اسیدی و قلیایی و یا به عبارتی حذف پروتئین‌های "هم" و همینطور می‌تواند مرتبط با میزان رطوبت نمونه‌ها باشد (Nolsøe & Undeland, 2009).

تجزیه و تحلیل SDS-PAGE حاصل از بازیافت تیمارهای اسیدی و قلیایی آشکار می‌سازد که پروتئین‌های ماهیچه (شامل پروتئین‌های میوفیبریلی) بعد از سانتریفوژ اول در هر دو تیمار (فرآیندهای اسیدی و قلیایی) وجود دارند (Kristinsson *et al*, 2005). همچنین مقادیر قابل توجهی از پروتئین‌های میوفیبریلی در رسوب لایه پایینی از دست می‌رود. اتلاف پروتئین‌ها در این دو فاز موجب می‌شود که حجم زیادی از پروتئین بازیافت نشود. قسمت کمی از پروتئین هم در سانتریفوژ آخر در بخش رویی[2] از دست می‌رود، هر چند که فرآیند قلیایی نسبت به فرآیند اسیدی منجر به اتلاف پروتئینی بیشتری می‌شود (Kristinsson *et al*, 2005). مطالعات الکتروفورز نمونه‌ها نشان داد که شدت باندهای مربوط به آلفا اکتینین و اکتین در تیمارهای اسیدی با pH ۲/۵ و ۳ و قلیایی با pH ۱۰/۵ و ۱۱ قوی‌تر از تیمارهای ۳/۵ و ۱۱/۵ بود که این امر به دلیل اعمال pHهای مختلف و سپس رساندن به نقطه ایزوالکتریک در طی تولید بوده است که سبب تغلیظ پروتئین‌های میوفیبریلی می‌شود. از سوی دیگر همانطور که مشاهده می‌شود تفاوت چندانی در شدت باند مربوط به زنجیره سبک میوزین در نمونه‌ها مشاهده نمی‌شود. با افزایش pH کاهش خاصی در شدت باندهای اصلی پروتئینی موجود در نمونه‌ها مشاهده نشد. این امر نشان می‌دهد که پایداری این پروتئین‌ها هنگام بالارفتن pH مناسب بوده است. با توجه به شناسایی پروتئین‌ها در pHهای مختلف اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۳/۵ و ۱۱/۵ با دیگر تیمارها دیده شد. این در حالی است که بین نمونه های حاصل از تیمارهای ۲/۵، ۳ و ۱۰/۵، ۱۱، این تفاوت معنی‌دار نبود. این مهم می‌تواند به دلیل مقدار پروتئین ایزوله در pHهای مختلف و نیز

1 loin

2supernatant

دناتوره شدن پروتئین‌ها به دلیل تغییراتpH باشد که خود منجر به تفاوت ویژگی‌های کاربردی پروتئین‌های ایزوله می‌شود (Hultin& Kristinsson, 2004).

تشکیل ژل توسط پروتئین‌های ماهی مهم‌ترین گام در ایجاد یک بافت مناسب در بسیاری از فرآورده‌های شیلاتی است (Lanier *et al*, 2005). به این منظور آزمونTPA به صورت گسترده‌ای برای برآورد تجربی کیفیت بافت غذاهای پروتئینی استفاده می‌شود. این آزمون شامل فشردن نمونه بین دو صفحه‌ی موازی بوده و در این فرآیند مقادیر نیرو در برابر تغییر شکل ثبت می‌گردند. سنجش بافت نمونه‌ها نشان داد که پروتئین ایزوله‌ی تون از چسبندگی، بهم‌پیوستگی و ارتجاعیت پایینی برخوردار هستند. آزمون نفوذ و ارزیابی حسی برای تعیین قدرت ژلی نمونه‌ها نیز امتیاز پایینی داشتند. بطور کلی قدرت ژلی نمونه‌های ایزوله‌ی پروتئین تون ضعیف بوده و در مقایسه با قدرت ژلی ایزوله‌ی پروتئین حاصل از فیله ماهی یا باقی مانده‌ی مواد حاصل از فرآورش آبزیان و نیز سوریمی پایین می‌باشند. با این حال قدرت ژلی تیمارهای ۲/۵ تا ۱۱ پایین‌تر از قدرت ژلی گزارش شده برای ایزوله‌ی ماهی حاصل از زائدات فرآوری ماهی کاد (۲۷۴g×cm) و ماهی سیث (۱۹۸g×cm) بودند (Shaviklo, 2007). در میان همه عوامل، مهمترین عامل‌های تاثیرگذار در کیفیت ژل حاصل از ایزوله‌ی پروتئین ماهی، گونه و نوع ماده‌ی خام، تغییرات پس از صید یا برداشت و دمای مورد استفاده در جابه‌جایی و طول دوره فرآورش و pH می‌باشد (Hultin *et al*, 2005; Choi & Park, 2002; Park *et al*, 2005; Park & Lanier, 2000). به همین دلیل سرد سازی سریع مواد خام پس از صید اهمیت زیادی دارد چرا که پس از مرگ دمای عضلات ماهی، به دلیل ادامه یافتن متابولیسم، در حدود ۵-۱۰°C، تمایل به بالا رفتن دارد (Lanier *etal*, 2005). در ماهی تون این عوامل از حساسیت بیشتری برخوردار است.

تازگی یکی از شاخص‌های کلیدی تاثیرگذار در کیفیت ایزوله‌ی پروتئین ماهی است. Hultin و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه بر روی قدرت ژلی ماهی هرینگ به این نتیجه رسیدند که ایزوله‌ی پروتئین هرینگ تازه بیش‌ترین قدرت ژلی (۸۱۰g×cm) و ایزوله‌ی پروتئین هرینگ نگهداری شده در یخ به مدت ۶ روز کم‌ترین قدرت ژلی (۲۸۷g×cm) را داشته اند. قدرت ژلی ایزوله‌ی پروتئین هرینگ منجمد نیز به ۲۸۷ g×cm کاهش یافته است. بنابراین تازگی و انجماد ماهی می‌تواند کیفیت ایزوله‌ی پروتئین ماهی را تحت تاثیر قرار دهند.

تون‌ماهیان در کشور ما معمولا به شکل شکم پر و با استفاده از یخ جابه‌جا می‌شوند؛ هر چند بخشی از صید در شناورهای مجهز به سردخانه منجمد شده و به این شکل به ساحل حمل می‌شوند. طولانی بودن زمان صید تا تخلیه و نیز انتقال صید به سردخانه و سپس به کارخانه‌های کنسروسازی منجر به افت کیفیت ماهی می‌شود. از سوی دیگر نوسان دما در سردخانه‌ها و در هنگام حمل و نقل موجب صدمه دیدن پروتئین‌های گوشت و تغییر ماهیت آن‌ها می‌شود. در نتیجه پروتئین استخراج شده از چنین ماده‌ی خامی دارای قدرت ژلی مناسبی نخواهد بود. با این حال می‌توان برای استحکام ژل و افزایش قدرت ژلی از افزودنی‌های پروتئینی استفاده کرد. هر چند که از چنین فرآورده‌یی نمی‌توان فرآورده‌های ژلی ماهی تولید کرد ولی این ماده را می‌توان به دلیل داشتن پروتئین بالا در ساخت و غنی‌سازی فرآورده‌های خوراکی مورد استفاده قرار داد (Shaviklo, 2011).

قدردانی

از پشتیبانی‌های دانشگاه تربیت مدرس، صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، مرکز رشد واحدهای فناوری طبرستان، شرکت آذین مهرخزر در اجرای این پژوه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

رضوی شیرازی، ح ، ۱۳۸۰، تکنولوژی فرآورده های دریایی: علم فرآوری (۲)، تهران: انتشارات نقش مهر، ص. ۲۵۵.

سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۳، سالنامه‌ی آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۹۲-۱۳۸۲، دفتر برنامه و بودجه سازمان شیلات ایران، تهران.

موسوی نسب، م.، آزادیان، م. و یوسفی، ع.،۱۳۹۰، تولید سوریمی و پروتئین ایزوله از ماهی کپور نقره ای(Hypophthalmichthys molitrix) و بررسی تغییرات مؤلفه‌های رنگی و شیمیایی نمونه‌های ژل و پودر تولیدی از آنها، مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۳)، ۱۰-۱.

AOAC., 1995, Official methods of analysis, Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Aspmo, S.I., Horn, S.J. & Eijsink, V.G.H., 2005, Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (Gadus morhua L.) viscera. *Process Biochemistry*. 40, 1957-1966.

Batista, I., 1999, Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. *European Food Research and Technology*. 210, 84-89.

Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P., 2009, Food chemistry, 4rd Edition, springer publishers, *Berlin Heidelberg*, 43.

Choi, Y.J. & Park J.W., 2002, Acid-Aided Protein Recovery from Enzyme-rich Pacific whiting. *Journal of Food Science*. 67, 2962-2967.

Davenport, M., Theodore, A.E. & Kristinsson H.G., 2004, Influence of insoluble muscle components on the gelation

properties of catfish protein isolates made with acid and alkali-aided processing. Abstract 83A-21, IFT Annual Meeting; Las Vegas, Nev.; Chicago, Ill. *Institute of Food Technologists*.

Davenport, M. & Kristinsson H.G., 2011, Channel Catfish (Ictalurus punctatus) muscle protein isolate performance processed under different acid and alkali pH values. *Journal of Food Science*. 76(3), 240-247.

Emin-Erdem, M., Kakayci, F., Avni-Duyar, H. & Samsun S., 2009, Shelf Life and Biochemical Composition of Bonito Fish (Sarda Sarda Bloch 1758) Stored at 4°C and Fishing with Different Fishing Tools. *Journal of Muscle Foods*. 20(2), 242-253.

FAO/WHO, 2005, Codex code for frozen surimi, In: Park J.W., editor, Surimi and Surimi Sea Food.Boca Raton, *Taylor and Francis Group*.869-885.

Hultin, H.O. & Kelleher, S.D., 2000, Surimi processing from dark muscle fish. In: Park J.W., editor, Surimi and surimi seafood, New York, *Marcel Dekker*. 59–77.

Hultin, H.O., 2002, Recent advances in surimi technology. In: Fingerman M., Nagabhushanam R., editors, Recent advances in marine biotechnology. Enfield, N.H. *Science Publishers*.7, 241–51.

Hultin, H. O. & Kelleher S. D., 2002, Protein composition and process for isolating a protein composition from a muscle source.*Patent* US6451975.

Hultin, H.O., Kristinsson, H.G., Lanier, T.C. & Park J.W., 2005, Process for Recovery of Functional Proteins by pH-shifts. In: Park J.W., editor, Surimi and Surimi Seafood. *Taylor and Francis Group*. Boca Raton, 107-139.

Huss, H. H., 1998, Fresh Fish: Its Quality and Quality Changes. *Food and Agricultural Organization*, Rome.

Kanoh, S., Suzuki, T., Maeyama, K., Takewa, T., Watabe, S. & Hashimoto K., 1986, Comparative Studies on Ordinary and Dark Muscle of Tuna Fish. Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography. 52(10), 1807-1816.

Kim, Y.S., Atdigul, J.Y., Park, J.W. & Thawornchinsombut S., 2005, Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with myofibrillar proteins. *Journal of Food Biochemistry*. 29, 517–532.

Kristinsson, H.G. & Rasco, B.A. 2000, Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(1), 43-81.

Kristinsson, H.G., 2002, Conformational and functional changes of hemoglobin and myosin induced by pH: Functional role in fish quality [DPhil dissertation].Amherst, Mass, Univ. of Massachusetts.

Kristinsson, H.G. & Demir, N., 2003, Functional Fish Protein Ingredients from Fish Species of warm and Temperate Waters: Comparison of Acid and Alkali-Aided Processing Vs. Conventional Surimi Processing. Advances in Seafood By products, Fairbanks, AK; Alaska Sea Grant College Program.

Kristinsson, H.G. & Hultin, H.O., 2003, Changes in Conformation and Subunit Assembly of Cod Myosin at Low and High pH and after Subsequent Refolding. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51, 7187-7196.

Kristinsson, H.G. & Hultin, H.O., 2003, Changes in Conformation and Subunit Assembly of Cod Myosin at Low and High pH and after Subsequent Refolding. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51, 7187-7196.

Kristinsson, H.G., Theodore, A.E., Demir, N. & Ingadottir B., 2005, A comparative study between acid and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. *Journal of Food Science*. 70(4), 298-306.

Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680–5.

Lanier, T., Carvajal, P. & Yongsawatdigul J., 2005, Surimi gelation chemistry, In Park J. W. (Ed.), Surimi and surimi seafood. *Boca Raton*. CRC, 435–477.

Lindsay, R.C., 1991, Flavour of fish, Paper presented at 8th World Congress of Food Science and Technology.Toronto, Canada.

Nakamura, Y. N., Ando, M., Seoka, M., Kawasaki, K. & Tsukamasa Y., 2007, Changes of Proximate and Fatty Acid Compositions of the Dorsal and Ventral Ordinary Muscles of the Full-cycle Cultured Pacific Bluefin Tuna Thunnus Orientalis with the Growth. *Food Chemistry*. 103(1), 234-241.

Natseba, A., Lwalinda, I., Kakura, E., Muyanja, C.K. & Muyonga J.H., 2005, Effect of pre-freezing icing duration on quality changes in frozen Nile perch (Lates niloticus). *Food Research International*. 38(4), 469-474.

Nolsøe, H. & Undeland I., 2009, The Acid and Alkaline Solubilization Process for the Isolation of Muscle Proteins, State of the Art. Food Bioprocess Technology. 2, 1-27.

Onyango, C. A., Izumimoto, M. & Kutima P. P, 1998, Comparison of Some Physical and Chemical Properties of Selected Game Meats.*Meat Science*. 49(1), 117-125.

Ovissipour, M.R., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. & Shahiri H., 2009, The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (Acipenser persicus) viscera. *Journal of Food Chemistry*. 115, 238-242.

Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N. & Kontominas M. G., 2003, Effect of Gutting on Microbiological, Chemical, and Sensory Properties of Aquacultured Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Stored in Ice. *Food Microbiology*. 20(4), 411-420.

Park, J. W. & Lanier, T. C., 2000, Processing of Surimi and Surimi Seafood. In Marine Freshwater Products Handbook; R. E. Martin, Ed., Technomic Publishing Company: *Lancaster*, NH.

Park, J.W., 2004, Surimi Gel preparation and texture analysis for better quality control, In: Sakaguch`i M., editor, More efficient of fish and fisheries products. *Hardbound*, 333-341.

Park, J.W., Yongsawatdigul, J. & Lin T.M., 2005, Surimi: Manufacturing and evaluation. In: Park J.W., editor. Surimi and surimi sea food, Boca Raton: *Taylor and Francis Group*, 33-106.

Petty, H. & Kristinsson, H. G., 2004, Impact of antioxidants on lipid oxidation during acid and alkali processing of Spanish mackerel. 2004 IFT Annual Meeting 49B-7, Las Vegas, NV, IFT, 7-12-2004, *Conference Proceeding*.

Sánchez-Zapata, E. & Pérez-Alvarez, J. A., 2007, The Color in Different Fish Species. Alimentación, *Equipos y Tecnología*. 219, 39-43.

Sánchez-Zapata, E., Amensour, M., Oliver, R., Fuentes-Zaragoza, E., Navarro, C., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas, E. & Pérez-Alvarez J.A., 2011, Quality Characteristics of Dark Muscle from Yellowfin Tuna (Thunnus albacores) to Its Potential Application in the Food Industry. *Food and Nutrition Sciences*. 2, 22-30.

Shaviklo, G.R., 2007, Quality assessment of fish protein isolates using surimi standard methods, PDF E-Book, United Nations University- Fisheries Training Programme, Reykjavik, Iceland. Book URL [http://www.unuftp.is/static/fellows/document/reza06prf.pdf]

Shaviklo, G.R., 2008, Fish protein isolate; a new source of protein ingredient.INFOFISH International. 4, 45-48.

Shaviklo, G.R., 2011, Using product development approach for increasing fish consumption in the Near East region. INFOFISH International. 4, 47-52.

Shaviklo, A.R., Thorkelsson, G. & Arason S., 2012, Quality Changes of Fresh and Frozen Protein Solutions Extracted from Atlantic Cod (Gadus morhua) Trim as Affected by Salt, Cryoprotectants and Storage Time. *Turkish Journal of Fish Aquatic Science*. 12, 41-51.

Sikorski, E., Kolakowska, A. & Sun-Pan B., 1994, Nutrient Composition of the Major Groups of Marine Food Organisms. In: Sikorski E., Ed., Technology seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation, *Acribia*, Zaragoza, Spain. 41-70.

Thawornchinsombut, S. & Park, J.W., 2006, Frozen Stability of Fish Protein Isolate under Various Storage Conditions. *Journal of Food Science*. 71, 227-230.

Undeland, I.A., Kelleher, S.D. & Hultin H.O., 2002, Recovery of Functional Proteins from Herring (Clupea Harengus) Light Muscle by an Acid or Alkaline Solubilization Process.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 7371-7379.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 463-476

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۷۶-۴۶۳

A comparative study on stability and functional properties of the proteins isolated from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dark muscle by acid-aided and alkaline-aided processes

N. Kamali-Damavandi[1], A. R. Shaviklo[2*], A. Motamedzadegan[3]

Received: 2014.10.18
Accepted: 2015.01.13

Introduction: At least 60% of the estimated 300,000 metric tons of tuna that are processed in Iran areby-products which arebeingwasted and converted to non-human products as fish meal or fertilizers. Therefore, a major challenge facing the tuna canning industry is to find the new processes to utilize tuna processing by-products (mainly dark muscle) into valuable foods. The characteristics of tuna dark meat (TDM) make it not acceptable for these industries. Therefore, the isolation of proteins from TDM for food application would be a more responsible way of using a nutritious and abundant rest raw material.

The pH-shift technology for recovering fish proteins involves the solubilisation of chopped and homogenized fish flesh either in an aqueous acidic or alkaline solution. The protein rich solution is separated from solids (insoluble proteins, skin, bones, and scales) and neutral lipids by centrifugation. The soluble proteins are then recovered by isoelectric precipitation by adjusting the pH to 5.5 and the precipitated proteins are removed by centrifugation. This method can be potentially applied with any white/ dark muscle fish or fish by-products. No evidence can be foundon isolation of protein from TDM. Therefore, this study was carried out to investigate stability and functional properties of proteins recovered from TDM.

Materials and methods: The ground TDM was homogenized for 1 min (speed 50) with 9 volumes of ice-cold distilled water. The proteins in the homogenate were solubilized by dropwise addition of 1 N HCl or 1 N NaOH until the intended pH (2.5, 3.0 and 3.5or10.5,11.0 and 11.5) was reached. The protein suspension was centrifuged. The soluble proteins were precipitated by adjusting the pHs to 5.5 using 1 N NaOH or 1 N HCl. Precipitated proteins were collected via a second centrifugation. Proximate analysis of tuna protein isolates (TPI) was carried out. TBARS, pH, viscosity, water holding capacity (WHC), gel strength, biting and folding tests, texture profile analyses (TPA), and color were measured. Qualitative protein analysis was carried out using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Results and discussion: The protein, fat and moisture contents of the acid-aided protein isolates were found to be 28.65, 5.35 and 74.36% respectively. While alkaline-aided protein isolates contained 29.57% protein, 4.17% fat and 71.23% moisture. A significant difference was found in TBARS level between the isolated products. The lowest TBARS value was found in acid-aided isolate and isolate treated at pH 11.5. The TBARS value of isolates extracted at pH 10.5 and 11 was 0.15 mg malondialdehyde / kg, which was below the border line recommended for fish products. Lipid oxidation in fish protein isolates has been reported during pH-shift process. The lipid content of TPI samples and activating of haem proteins as prooxidants at different pH may describe lipid oxidation in TPI samples.

The average viscosity of TPIs was 3.81 cP (Centipoise). The highest viscosity scores were observed for the isolates prepared at pH 11.0 followed by the isolates made at pH 3.5 and 11.5. The isolates treated at pH of 2.5, 3.0 and 10.5 had the same level of viscosity. Low viscosity might be due to low cross linking degree of protein molecules. The low viscosity of the prototypes may possibly be explained by decreasing interaction between proteins and the surrounding medium. Therefore, denaturation and modification of protein conformation in tuna protein samples may have affected the viscosity.

The WHC of the samples (12-16%) was similar to the proteins isolated from the other fish by-products. The highest value of WHC among TPIs was found for the isolates prepared at pH 3.5. The rest samples had the same

1- Department of seafood processing, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Iran
2- Department of Animal Products Processing, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3- Department of Food Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Sari, Iran
(*-Corresponding Author Email: shaviklo@gmail.com)

value of viscosity. The WHC can be defined as the ability of a protein gel to retain water against a gravitational force. The level of water retained in a gel is affected by the same factors that affect the formation of a good protein gel *'i.e.'* moisture, pH and salt. Furthermore, the WHC usually reflects the extent of denaturation of the protein and water contents. It has been reported that WHC is closely related to fish species, amount of salt, different processing method and the interaction between these factors.

The highest scores for gel strength, biting and folding tests and TPA (hardness, cohesiveness, springiness and resilience) were observed in TPIs treated at alkaline pH. The muscle proteins being particularly responsible for gelation are myosin and actomyosin. It has been reported that alkali-aided protein extraction caused less denaturation than an acid-aided process. This lower denaturation of proteins leads to products with enhanced texture. Hardness and cohesiveness were found to be maximum for samples prepared at pH of 11.5. The increase in hardness may also be due to the stronger gel network formed by the concentrated myofibrillar proteins in the protein isolates. The difference between TPA parameters of the recovered proteins andthe TDM mightbe due to the difference in lipid and collagen content.

The alkali-aided process recovered proteins of higher whiteness than the acid-aided process possibly due to high removal amount of myoglobin and haemoglobin during leaching. The electrophoretic patterns revealed the stability of proteins in alkaline pH. The lowest reduction in band intensity of myosin (myosin heavy chain) and actin was found when the alkaline-aided process was applied. Accordingly the highest band intensity of myosin and actin proteins was observed at the high pH (11). The weak bands of protein among acid-aided samples have possibly been due to the hydrolysis effect of enzyme activity.

Keywords: Tuna protein isolates, Yellow fin tuna, Dark muscle, pH-shift

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 477-488

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۸۸-۴۷۷

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اولئوگم رزین کندر (*Boswellia serrata*) در روغن سویا

عادله محمدی[۱] ، سعیده عربشاهی دلویی[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۱

چکیده

در این پژوهش ترکیبات فنولی اولئوگم رزین کندر توسط حلال‌های مختلف (متانول ، اتانول و استون) به روش غرقابی استخراج گردید، سپس میزان ترکیبات فنولی به روش فولین- سیوکالتو محاسبه شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ای که بالاترین مقدار ترکیبات فنولی را به خود اختصاص داده بود (عصاره متانولی، ۰/۲۳± ۲۵۴/۲۷ میلی‌گرم اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم عصاره)، توسط آزمون مهار رادیکال DPPH اندازه‌گیری گردید. در مرحله بعدی پایداری اکسایشی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی چهار غلظت عصاره متانولی (۱۰۰۰ و ۸۰۰، ۵۰۰، ۲۰۰ پی‌پی‌ام) به همراه آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ(۱۰۰ پی‌پی‌ام) در روغن سویای فاقد آنتی‌اکسیدان ارزیابی گردید. با توجه به نتایج آزمون گرم‌خانه گذاری مشخص شد که عصاره متانولی۱۰۰۰ پی‌پی‌ام نسبت به سایر عصاره‌ها پایداری حرارتی بیشتری در روغن داشته و اگرچه توان رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ را ندارد، لیکن در مهار عدد پراکسید و اندیس تیوباربیتوریک اسید عملکرد قابل‌توجهی نشان داده است. نتایج این مطالعه حاکی از این امر بود که اولئوگم رزین کندر از توانایی ضداکسایشی خوبی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی : اولئوگم رزین کندر، ترکیبات فنولی، اکسایش، زمان القاء، روغن سویا

مقدمه

اکسایش لیپیدها یکی از مهم‌ترین دلایل تخریب موادغذایی مانند فراورده‌های گوشتی، لبنی و صنایع روغن می‌باشد. این واکنش‌ها در غذا منجر به توسعه طعم و بوی نامطلوب و در نتیجه افت ویژگی‌های ارگانولپتیک و کیفیت تغذیه‌ای محصولات غذایی خواهد شد. جهت ممانعت یا به تاخیر انداختن اکسایش موادغذایی، آنتی‌اکسیدان‌ها بعنوان یک افزودنی در فراوری موادغذایی استفاده می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که از سرعت واکنش‌های اکسایشی می‌کاهند. این مواد بسته به نوع ساختمان‌شان، در واکنش‌های مختلفی از قبیل کند کردن مرحله آغاز و انتشار، مهار کاتالیزورها، پایدار ساختن هیدروپراکسید، ترکیب‌شدن با رادیکال‌های آزاد شرکت می‌نمایند (فاطمی، ۱۳۷۸). در موجودات زنده نیز پراکسیداسیون لیپیدهای موجود در دیواره سلول‌ها از جمله مهمترین اهداف رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در این شرایط نه تنها ساختمان دیواره و عملکرد آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد بلکه بعضی از محصولات ناشی از اکسایش مانند مالون‌دی‌آلدهیدها نیز می‌توانند با بیومولکول‌ها واکنش نشان داده و آثار سرطان‌زایی از خود بروز دهد (کامکار، ۱۳۸۸).

دانشمندان براین باورند که رادیکال‌های آزاد نقش عمده‌ای در توسعه بیماری‌های مربوط به پیری مانند پارکینسون، اختلال التهابی، بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان، ورم مفاصل، آلزایمر و پیری زودرس برعهده دارند؛ رادیکال‌های آزاد در طول فرایندهای اکسایشی در موجود زنده بوجود آمده و بعنوان تهدیدی برای سلامت به شمار می‌آیند (Wang *et al.*, 2013). آنتی‌اکسیدان‌ها اساسا دارای ساختمان فنولی با یک یا چند عامل هیدروکسیل می‌باشند. ترکیبات فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسایش چربی را مهار کرده و لذا ارتباط مستقیمی نیز بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. در حال حاضر، آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی هیدروکسی آنیزول بوتیلات (BHA)، هیدروکسی تولوئن بوتیلات (BHT)، پروپیل گالات (PG) و ترت بونیل هیدروکینون (TBHQ) دارای کاربرد زیادی در صنعت غذا هستند، ولی علی‌رغم کارایی و پایداری بالا و نیز ارزانی نسبی، مصرف آنها به دلیل خاصیت سرطان‌زایی و تمایل روز افزون مردم جهت

۱- دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، گروه علوم و صنایع غذایی، آزادشهر، ایران
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران
(* - نویسنده مسئول: Email: saeedeh_arabshahi@yahoo.com)

ممانعت از مصرف افزودنی‌های سنتزی در موادغذایی رو به کاهش گذارده است (Loliger, 1991). عدم پذیرش افزودنی‌های سنتزی باعث شده تحقیقات گسترده‌ای پیرامون یافتن جایگزین‌های طبیعی مواد آنتی‌اکسیدانی انجام گیرد، ویژگی‌های سلامتی‌بخش آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و نقش آنها در پیشگیری از بیماری‌ها، بویژه در محصولات غذایی فراسودمند آنها را به گزینه‌ای مناسب جهت این مهم مبدل ساخته است . صمغ‌های طبیعی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات ترپنی فعال بوده و لذا جهت جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنعت غذا قابل استفاده می‌باشند. اولئوگم رزین کندر از تنه درختان *Boswellia* که در هندوستان، شمال آفریقا و خاورمیانه می‌رویند، بدست می‌آید. این جنس دارای ۲۵ گونه متفاوت است که عمده‌ترین گونه‌های تولیدکننده کندر شامل *Boswellia carteri*، *Boswellia frereana*، *Boswellia serrata*، *Boswellia papyrifera* می‌باشد. اولئوگم رزین کندر از سه جزء اساسی تشکیل شده است که شامل ۹-۵٪ اسانس، ۸۵ - ۶۵٪ رزین قابل حل در الکل و باقی‌مانده نیز شامل صمغ قابل حل در آب می‌باشد. روغن یا اسانس فرار مجموعه‌ای از ترکیبات منوترپنی و سزکویی‌ترپنی می‌باشد؛ قسمت عمده صمغ از آرابین و باسورین تشکیل یافته است که این ترکیبات نامحلول در الکل هستند و ترکیبات رزینی کندر نیز شامل قندهای پنج و شش کربنه به همراه تعدادی از آنزیم‌های گوارشی، اکسیداتیو و ترکیب‌های ترپنی می‌باشد. مهم‌ترین قسمت کندر، بخش رزینی آن است که عمدتا از اسیدهای پنتاسیکلیک تری‌ترپنی با نام بوسولیک اسید ($C_{20}H_{32}O_4$) تشکیل شده است . قابل ذکر است که نوع و غلظت ترکیبات تشکیل‌دهنده این اولئوگم رزین به عوامل متعددی مانند نوع گونه، شرایط آب و هوایی منطقه رویش، فصل و زمان برداشت محصول وابسته است (Khan and Farooqi, 1991 ; Tucker, 1986) . طی دو دهه‌ی اخیر خواص دارویی و سلامتی‌بخش کندر بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است، به‌طوری‌که تحقیقات گوناگون اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد ویروسی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف این صمغ را تایید نموده‌اند (Basar *et al*., 2001 ; Van Vuuren *et al*.,2010). غربالگری فیتوشیمیایی گونه *Papyrifera* کندر توسط گاربا و همکاران (۲۰۱۳)، وجود ترکیباتی مانند فلاونوئید، ترپنوئید، استروئید، تانن، ساپونین و کومارین‌ها را در این اولئوگم رزین مشخص نموده است. نتایج این تحقیق نمایان ساخته است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی کندر قابل توجه بوده، به‌نحوی که غلظت ۱ میلی‌گرم/ سانتی‌متر مکعب از فراکسیون اتیل- استات توانسته است به میزان ۷۰/۴ ٪ رادیکال آزاد DPPH را مهار نماید.

پراکاش و همکاران (۲۰۱۳)، ساختار شیمیایی، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و ضدآفلاتوکسینی اسانس کندر (*B.carterii*) را بررسی نمودند. نتایج کروماتوگرافی گازی- جرمی حاکی از شناسایی ۳۱ ترکیب مختلف در این اسانس بود و نتایج آزمون آنتی‌اکسیدانی نیز نشانگر این امر بود که اسانس کندر قادر است اکسیداسیون اسید لینولئیک را به میزان ۵۱/۶۸٪ مهار سازد. تحقیقات محمدعبدالطیف و همکاران (۲۰۱۲)، مشخص نمود که اسانس و عصاره متانولی کندر (*B.sacra* , *B.papyrifera*) فعالیت ضدمیکروبی موثری بر میکروارگانیسم‌های مهم صنعت غذا مانند *باسیلوس سرئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلا دیزنتری* دارد. هدف از این پژوهش بررسی ترکیبات فنولی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره الکلی اولئوگم رزین کندر در روغن سویا و مقایسه آن با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره

اولئوگم رزین کندر واریته *serrata* از عطاری تهیه گردید، سپس با استفاده از آسیاب برقی (MOULINEX مدلAR1043) پودر و از الک با مش ۴۰ میکرون عبور داده شد و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. سپس پودر حاصله با نسبت ۱۰:۱ با حلال‌های (متانول ، اتانول و استون) در دمای محیط توسط شیکر (IKA مدل MTS) به مدت ۱۰ ساعت هم‌زده شد. بعد از طی شدن مدت زمان استخراج، عصاره با کاغذ صافی (واتمن شماره ۴۲) صاف گردید، حلال آلی با استفاده از یک تبخیرکننده چرخشی (Buchiمدل V800) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد از عصاره جدا گردید. عصاره‌های حاصله در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند (Arabshahi-Delouee and Urooj,1977). تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش با خلوص بالا و از شرکت مرک تهیه شدند.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

میزان کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. این روش براساس احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می‌دهد. به طور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد) به آن‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش درون حمام آب (Memmert مدل WB14) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil مدل Aquarius) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده

شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم عصاره بیان شد (Slinkard and Singleton,1977).

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

محلول DPPH به رنگ بنفش تیره است و با توجه به قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، این رادیکال مهار شده و رنگ این محلول روشن می‌شود. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰- ۱۰۰پی‌پی‌ام) از عصاره و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ در حلال متانول آماده شدند. سپس یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از غلظت های مختلف عصاره‌ها افزوده و مخلوط به دست آمده به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرارگرفتند. سپس میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید.

(۱) درصد مهار رادیکال آزاد = (Ac-As)/Ac×100

در فرمول فوق As و Ac ، به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند (Blois,1958).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در روغن سویا توسط آزمون گرم‌خانه‌گذاری

عصاره متانولی کندر در چهار غلظت (۱۰۰۰- Met و ۸۰۰- Met، ۵۰۰- Met ، ۲۰۰ - Met پی‌پی‌ام) به همراه آنتی‌اکسیدان سنتزی (۱۰۰-TBHQ پی‌پی‌ام) به روغن سویای تصفیه شده، فاقد آنتی‌اکسیدان و اسید سیتریک افزوده و در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ روز در گرم‌خانه (Memmert مدل UNB 400) نگهداری شد. در طی این مدت، میزان پیشرفت اکسایش روغن در روزهای ۰،۲،۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ با اندازه‌گیری اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید تعیین گردید.

اندازه‌گیری عدد پراکسید

آزمون پراکسید مطابق با (AOAC, 2003) انجام شد. ابتدا به ۵ گرم روغن ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک- کلروفرم افزوده شد و پس از همزدن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول یدید پتاسیم اشباع، سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و با تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ تا از بین رفتن رنگ زرد تیتر شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف شناساگر نشاسته اضافه شد و تیتراسیون تا از بین رفتن رنگ آبی ادامه یافت. همراه با نمونه، تیتراسیون شاهد نیز انجام شد. در نهایت عدد پراکسید توسط فرمول زیر محاسبه شد.

(۲) عدد پراکسید (میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم نمونه روغن)= ((S-B)× N× 1000)/ W

در این فرمول S میزان تیوسولفات سدیم مصرفی نمونه، B میزان تیوسولفات سدیم مصرفی شاهد،N نرمالیته تیوسولفات سدیم مصرفی بر حسب اکی‌والان بر لیتر و W وزن نمونه روغن بر حسب گرم می‌باشد.

برای تعیین درصد مهار تولید پراکسید توسط هر تیمار از فرمول ذیل استفاده گردید:

(۳) مهار تولید پراکسید (٪) = (عدد پراکسید شاهد- عدد پراکسید نمونه)/عدد پراکسید شاهد ×۱۰۰

همچنین زمان القاء(IP)[1] که نشان‌دهنده عدد پراکسیدی معادل ۲۰ میلی‌اکی والان بر کیلوگرم است و فاکتور حفاظتی نیز طبق فرمول ذیل محاسبه گردید (Povilaityte and Venskutonis, 2000).

(۴) فاکتور حفاظتی(PF)[2] = زمان القاء نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان /زمان القاء نمونه فاقد آنتی‌اکسیدان

اندازه‌گیری عدد تیوباربیتوریک اسید

اندازه‌گیری این شاخص مطابق با استاندارد (AOCS,2009) انجام گرفت. به این ترتیب که ۲۰۰ میلی‌گرم روغن با حلال ۱- بوتانول به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط روغن- بوتانول مربوط به هر تیمار، به لوله‌های آزمایش خشک انتقال داده شد و ۵ میلی‌لیتر محلول واکنشگر تیوباربیتوریک اسید (۲٪) به آن‌ها اضافه گردید. سپس همه‌ی لوله‌های آزمایش در حمام آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. بعد از سپری شدن زمان مربوطه و سرد شدن تیمارها، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil مدل Aquarius) خوانده شد. نتایج از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

(۵) عدد تیوباربیتوریک اسید =(50×(A- B)/ M)

در این رابطه A میزان جذب نمونه، B میزان جذب شاهد واکنشگر و M وزن نمونه بر حسب میلی‌گرم می‌باشد. همچنین برای تعیین درصد مهار تولید مالون آلدهید توسط هر تیمار از فرمول ذیل استفاده گردید:

(۶) مهار تولید مالون آلدهید (٪) = (عدد تیوباربیتوریک اسید شاهد- عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه)/عدد تیوباربیتوریک اسید شاهد ×۱۰۰

1 Induction Period
2 Protection Factor

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج بدست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p< ۰/۰۵$) و با استفاده از نرم افزار spss صورت گرفت. رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

مقدار ترکیبات فنولی کل

معادله خط رگرسیونی که رابطه غلظت اسید گالیک را با میزان جذب نشان می‌دهد به صورت ذیل می‌باشد؛ در این معادله Y مقدار جذب و X مقدار ترکیبات فنولی براساس میلی‌گرم اسید گالیک را مشخص می‌نماید :

$$Y= ۰/۰۰۱۱ x - ۰/۰۰۰۱ \qquad R^۲=۰/۹۹۴۹ \qquad (۷)$$

مقدار کل ترکیبات فنولی بدست آمده از حلال‌های مختلف در جدول ۱ مشخص شده است. عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی، گونه و واریته، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت، شرایط آب و هوایی منطقه، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری اشاره نمود (قادری قهفرخی و همکاران، ۱۳۸۹). نتایج مشخص ساختند که عصاره متانولی بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۲۵۴/۲۷ ±۰/۲۳ میلی‌گرم اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم عصاره) را نسبت به سایر حلال‌ها دارا می‌باشد. به‌طورکلی متانول در استخراج پلی‌فنول‌هایی با وزن مولکولی پایین کارآمدتر می‌باشد، در حالیکه استخراج ترکیباتی مانند فلاوانول که وزن مولکولی بالایی دارند توسط حلال استونی-آبی عملکرد بهتر و بیشتری نشان داده است Metivier *et al*.,1980; Labarbe *et al*.,1999). نتایج آزمایشات سایر محققان نیز نشان داده است که متانول جهت استخراج ترکیبات فنولی حلال کارآمدتری نسبت به سایر حلال‌ها می‌باشد چراکه پلی‌فنول‌های موجود در گیاهان از لحاظ قطبیت و حلالیت، سازگاری بالایی با این حلال دارند (Arabshahi-Delouee and Urooj,1977 ; Siddhuraju and Becker, 2003). از آنجا که عصاره متانولی کندر بیشترین میزان ترکیبات فنولی را نسبت به سایر عصاره‌ها به خود اختصاص داد، به عنوان تیمار منتخب جهت ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و همچنین بررسی فعالیت ضداکسایشی در روغن سویا انتخاب شد.

جدول ۱- میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های مختلف اولئوگم رزین کندر

تیمار	ترکیبات فنولی (میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم عصاره)
عصاره متانولی	۲۵۴/۲۷ ± ۱/۲۲ [a]
عصاره اتانولی	۱۷۲/۴۷ ± ۰/۹۸ [b]
عصاره استونی	۱۵۸/۱۱ ± ۱/۳۱ [c]

حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد است.

ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره متانولی و آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ در شکل ۳- ۱ مشخص شده است. در محدوده غلظت ۱۰۰۰- ۱۰۰ پی‌پی‌ام، قدرت مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ، ۹۸/۱۲- ۸۴/۲۸ درصد و عصاره متانولی اولئوگم رزین کندر ۷۸/۶۷ - ۳۲/۹۰ درصد اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج مشخص شد که غلظت عصاره تاثیر معنی‌داری ($p <۰/۰۵$) بر مهار رادیکال آزاد دارد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت خاصیت مهارکنندگی عصاره‌ها افزایش می‌یابد. با افزایش غلظت ترکیبات فنولی یا درجه هیدروکسیلاسیون این ترکیبات ، مهار رادیکال DPPH افزایش یافته که به عنوان افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعریف می‌شود (Zhou and Yu ,2004). نتایج تحقیق حاضر با نتایج عربشاهی و اروج (۲۰۰۷) و سان و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی داشت، این محققین نیز گزارش نمودند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های گیاهی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت می‌یابد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در آزمون گرم-خانه‌گذاری

ارزیابی عدد پراکسید

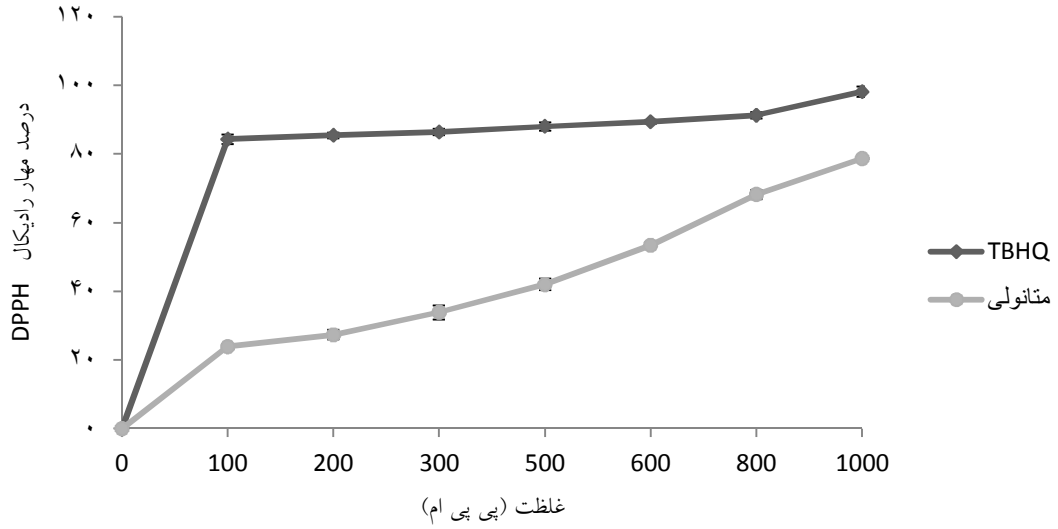
از لحاظ کیفیت و ایمنی موادغذایی تعیین عدد پراکسید یکی از مهم‌ترین پارامترهای کنترل کیفیت روغن‌های خوراکی محسوب می‌شود، چراکه شاخصی از وضعیت اکسایش اولیه روغن می‌باشد (Akinoso *et al*, 2010; Pizarro *et al*,2013). این شاخص مشخص‌کننده غلظت هیدروپراکسیدها در روغن می‌باشد، هیدروپراکسیدها از محصولات اولیه اکسایش بوده که بسیار ناپایدارند و به محصولات ثانویه اکسایشی مانند آلدهیدها و کتون‌ها تجزیه می‌شوند (Choe and Min, 2006 ; Mohammadi, 2013). شکل

۲ مقادیر عدد پراکسید غلظت‌های (۲۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) عصاره متانولی را در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ (۱۰۰ پی‌پی‌ام) و نمونه شاهد طی ۱۲روز گرم‌خانه گذاری (دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد) نشان می‌دهد. بررسی آنالیز واریانس(ANOVA) و نیز مقایسه میانگین اعداد پراکسید تیمارهای مختلف نشان داد که اثر تیمار و زمان بر روی عدد پراکسید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشد، به‌طوری‌که مقادیر پراکسید بدست آمده در طی روزهای چهارم، ششم، هشتم، دهم و دوازدهم تیمارهای مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند، اما در روز دوم اختلاف معنی‌داری بین تیمار۱۰۰- TBHQ و۱۰۰۰- MET همچنین ۸۰۰-MET و۵۰۰-MET با یکدیگر مشاهده نشد (p<۰/۰۵). در کلیه تیمارهای مورد بررسی، با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها در شرایط اکسایش، مقادیر عدد پراکسید سیر صعودی داشته است، این افزایش را می‌توان به تشکیل هیدروپراکسیدها یعنی محصولات اولیه اکسایش نسبت داد.

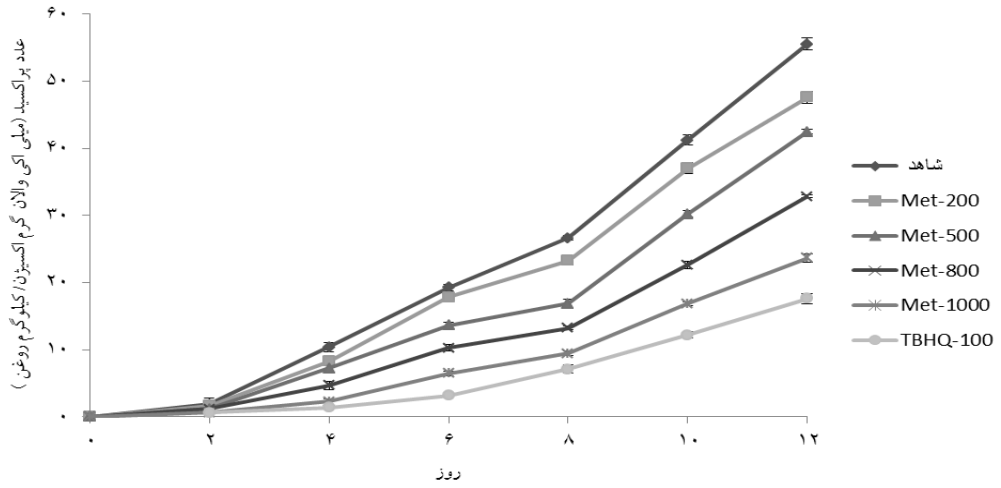
نمونه شاهد که حاوی هیچ آنتی‌اکسیدانی نبود در مقایسه با بقیه تیمارها بیشترین و تیمار ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره متانولی بعد از آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ، کمترین مقادیر عدد پراکسید را در طی مدت زمان نگهداری به خود اختصاص دادند. با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان عدد پراکسید کاهش و به تاخیراندازی اکسایش و اثر آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. تحقیقات انجام شده در این زمینه حاکی از وجود رابطه بین مقدار ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی بالاخص فنول‌ها و پایداری اکسیداتیو روغن‌ها می‌باشد (Baldioli *et al*., 1996; Shahidi and Wanasundara, 1994).

آنتی‌اکسیدان‌های فنولی با به دام انداختن رادیکال آلکوکسی چربی‌ها از فرایند اکسایش لیپیدها ممانعت می‌نمایند. این فعالیت با ساختار مولکولی ترکیب فنولی، تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل آنها رابطه مستقیم دارد (Milic *et al*.,1998). شکل۳ درصد مهار تولید پراکسیدتوسط کلیه تیمارها را نشان می‌دهد. بررسی آنالیز واریانس (ANOVA) تیمارهای مختلف نشان داد که اثر تیمار بر روی میزان مهارکنندگی اکسایش در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشد، به‌طوری‌که غلظت‌های بالاتر عصاره توانایی مهارکنندگی بیشتری دارند که این امر مرتبط با ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد. در کلیه تیمارها با افزایش غلظت، میزان مهار تولید هیدروپراکسیدها افزایش یافته است. البته قابل ذکر است که ترکیبات موثره موجود در اولئوگم رزین کندر ، بسیارمتنوع بوده بطوری‌که می‌توان کندر را منبعی غنی از تری‌ترپنوئیدهای غیر فراری مانند اورسان، اولئانان و لوپین دانست که دارای خواص بیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند.

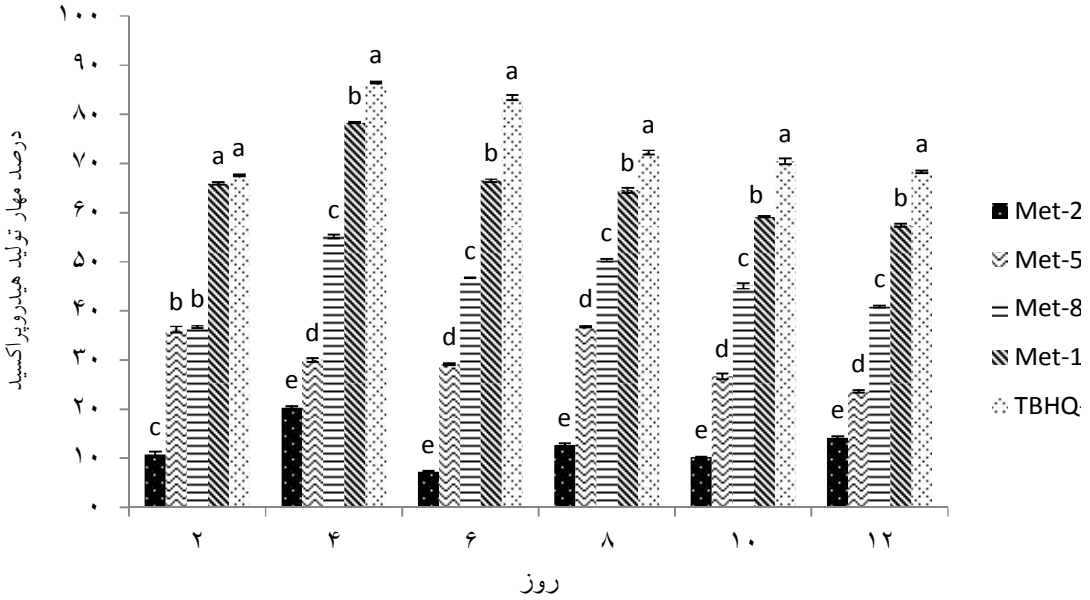
با توجه به تنوع زیاد ترکیبات ترپنی، این اولئوگم رزین توانایی خوبی در اهداء الکترون و واکنش با رادیکال‌های آزاد دارد، به‌نحوی که می‌تواند این رادیکال‌ها را به محصولات با ثبات‌تر تبدیل نموده و مانع واکنش‌های زنجیری اکسایشی شود(Al-Harrasi and Al-Saidi, 2008). عواملی مانند روش استخراج، عدم حضور ناخالصی‌ها در عصاره، نوع آزمون سنجش فعالیت ضداکسایشی، غلظت عصاره مصرفی و سایر شرایط به‌کار رفته جهت انجام آزمون از جمله دما و نیز نوع بستر چربی بر میزان فعالیت ضداکسایشی عصاره‌ها به طور چشم‌گیری تاثیر دارد (مظاهری کلهرودی و همکاران، ۱۳۹۲).



شکل ۱- درصد مهار رادیکال آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ



شکل ۲- روند تغییرات اعداد پراکسید غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی کندر، آنتی‌اکسیدان سنتزیTBHQ و نمونه شاهد طی ۱۲ روز گرمخانه گذاری (دمای ٦٣ درجه سانتی‌گراد) در روغن سویا.



شکل ۳- درصد مهار تولید پراکسید روغن سویا توسط تیمارهای مختلف طی ۱۲ روز گرم‌خانه‌گذاری (دمای ٦٣ درجه سانتی‌گراد).

زمان القاء (IP) کلیه تیمارها که نمایانگر مدت زمان لازم برای رسیدن به عدد پراکسیدی معادل ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد است و فاکتور حفاظتی (PF) که در واقع نمایانگر کارایی یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی است در جدول۲ محاسبه شده‌اند. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف عصاره متانولی کندر و آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ مشاهده شد (p<۰/۰۵). بطوری‌که با افزایش غلظت‌های مختلف عصاره زمان القاء و درپی آن فاکتور حفاظتی افزایش یافته است، این امر نشانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و توانایی آنها جهت به تاخیر انداختن فرایند اکسایش روغن سویا می‌باشد. به‌طورکلی روند افزایش فاکتور حفاظتی تیمارها به ترتیب ذیل می‌باشد:

Met -۲۰۰ <Met -۵۰۰ < Met - ۸۰۰< Met -۱۰۰۰<TBHQ-۱۰۰

جدول ۲- میزان زمان القاء و فاکتور حفاظتی تیمارهای مختلف

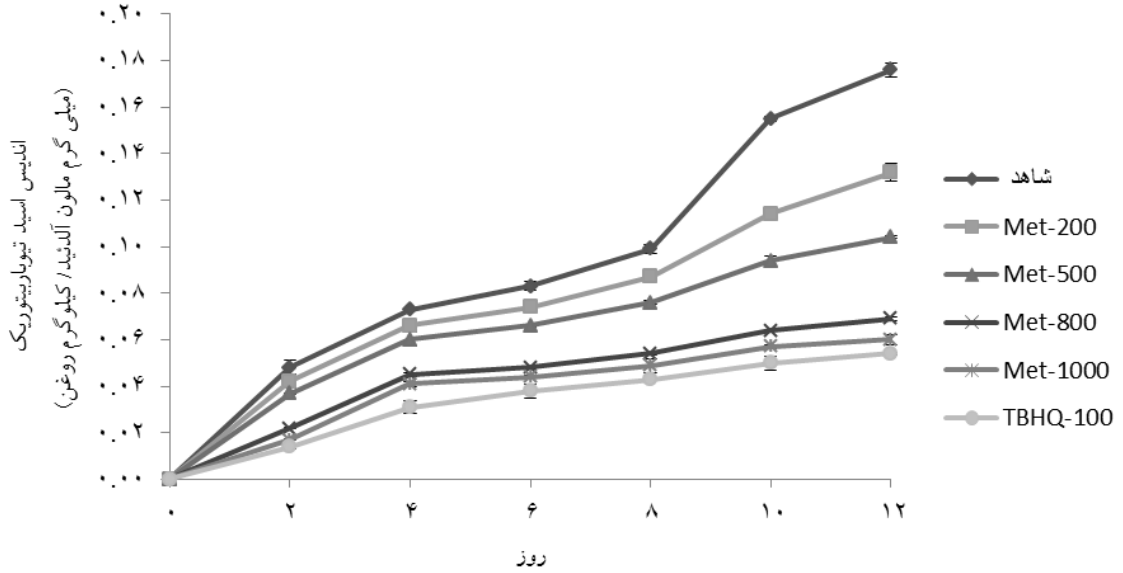
تیمار	زمان القاء(روز)	فاکتور حفاظتی
شاهد	۳/۷۷ ± ۰/۰۶^{f}	۱
Met -۲۰۰	۴/۰۷ ± ۰/۰۹^{e}	۱/۰۷
Met -۵۰۰	۴/۵۸ ± ۰/۰۸^{d}	۱/۲۱
Met -۸۰۰	۵/۴۷ ± ۰/۱۳^{c}	۱/۴۵
Met -۱۰۰۰	۶/۹۱ ± ۰/۱۰^{b}	۱/۸۳
TBHQ-۱۰۰	۸/۲۴ ± ۰/۰۴^{a}	۲/۱۸

ارزیابی عدد تیوباربیتوریک اسید

طی فرایند اکسیداسیون روغن‌ها، هیدروپراکسیدهای تولیدی به ترکیبات کم وزنی مانند انواع الکل‌ها، اسیدها، کتون و آلدهیدها تجزیه می‌شوند. اندازه‌گیری این محصولات ثانویه اکسایش توسط اندیس اسید تیوباربیتوریک شاخصی مفید جهت بررسی فرایند اکسایش روغن‌ها محسوب می‌شود (Siddhuraju and Becker, 2003).

شکل۴ مقادیر اسید تیوباربیتوریک غلظت‌های مختلف عصاره متانولی کندر و آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) و نیز مقایسه میانگین اعداد اسید تیوباربیتوریک تیمارهای مختلف نشان داد که اثر تیمار و زمان بر میزان عدد اسید تیوباربیتوریک در سطح احتمال ($p < ۰/۰۵$) معنی‌دار بوده است، همچنین نتایج بدست آمده مشخص ساختند که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف با یکدیگر وجود دارد. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها در کلیه تیمارهای مورد بررسی یک روند افزایشی در میزان عدد اسید تیوباربیتوریک مشاهده می‌شود که این روند در مورد نمونه شاهد شدیدتر بوده به‌نحوی که این تیمار دارای بالاترین اندیس اسید تیوباربیتوریک است. در آزمون تعیین عدد تیوباربیتوریک اسید نیز مشابه روش عدد پراکسید، شدت بروز خاصیت مهارکنندگی تولید مالون آلدهید به غلظت عصاره‌ها وابسته بود؛ در روزهای آغازین میزان عدد اسید تیوباربیتوریک پایین بوده و با گذشت زمان و افزایش تجزیه محصولات اولیه حاصل از اکسایش، مقدار مالون آلدهید و به تبع آن اندیس اسید تیوباربیتوریک افزایش یافته است.

همچنین تیمارهای آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ، عصاره متانولی ۸۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام روند تولید مالون آلدئید کندتری نسبت به سایر تیمارها نشان دادند که این امر به علت توانایی بیشتر این تیمارها در مهار سرعت تشکیل محصولات ثانویه اکسایش می‌باشد. به‌طورکلی به دلیل اثر آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از تجزیه‌ی هیدروپراکسیدها، سرعت تشکیل محصولات ثانویه‌ی اکسایش در تیمارهای حاوی آنتی‌اکسیدان کمتر از نمونه‌ی شاهد بود.

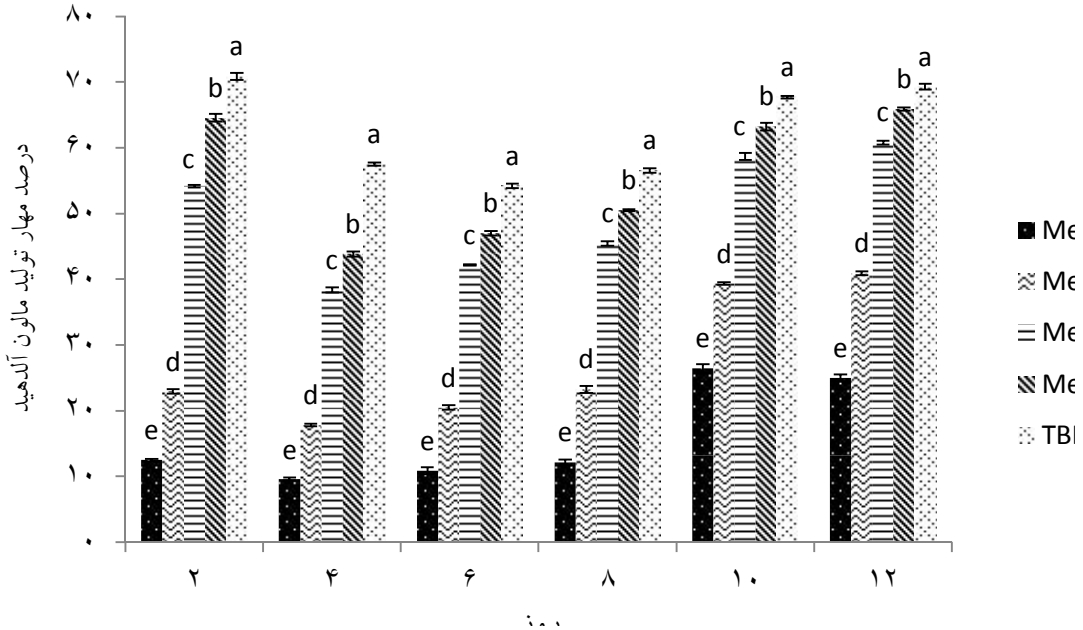


شکل۳-٤- روند تغییرات اعداد تیوباربیتوریک اسید غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی کندر، آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ و نمونه شاهد طی ۱۲ روز گرم‌خانه گذاری (دمای ٦٣ درجه سانتی‌گراد) در روغن سویا.

شکل ۵ درصد مهار تولید مالون‌آلدهید کلیه تیمارها را نسبت به نمونه شاهد در طی روزهای متوالی گرم‌خانه‌گذاری نشان می‌دهد، همان‌طور که مشخص است غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام عصاره متانولی کمترین (درصد) و آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ بالاترین (درصد) مهار تولید مالون‌آلدهید را طی ۱۲ روز گرم‌خانه‌گذاری به خود اختصاص داده‌اند، نتایج حاکی از این امر می‌باشد که با افزایش غلظت‌ها میزان قدرت مهارکنندگی تیمارها افزایش یافته است که نشانگر توانایی عصاره‌ها در مهار تولید محصولات ثانویه اکسایش نسبت به نمونه شاهد می‌باشد.

با توجه به نتایج آزمون گرم‌خانه‌گذاری مشخص شد که عصاره متانولی ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام اولئوگم رزین کندر (*B.serrata*) نسبت به سایر غلظت‌های انتخابی پایداری حرارتی و فعالیت ضداکسایشی بیشتری در روغن سویا داشته و اگرچه توان رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ را ندارد، لیکن در مهار تولید هیدروپراکسیدها و مالون‌آلدهید عملکرد قابل‌توجهی نشان داده است ؛ البته قابل ذکر است که آنتی‌اکسیدان TBHQ قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان سنتزی در صنعت روغن محسوب می‌شود، چرا که به علت ساختار مولکولی

ویژه‌اش و با در اختیار داشتن دو گروه هیدروکسیل در موقعیت پارا براحتی می‌تواند اتم هیدروژن را در اختیار رادیکال‌های آزاد قرار داده و به واکنش‌های زنجیره‌ای اکسایشی سریع‌تر خاتمه دهد Jiang and (Wang, 2006 ; Yang *et al*., 2013).



شکل ۵- درصد مهار تولید مالون آلدهید روغن سویا توسط تیمارهای مختلف طی ۱۲ روز گرمخانه‌گذاری (دمای ٦٣ درجه سانتی‌گراد).

نتایج تحقیقات بسیاری از محققان نیز تصدیق‌کننده این امر می‌باشد، بدان‌گونه‌که مهدالی و همکاران (۲۰۱۱)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تفاله کنجد *(Sesamum indicum)* را در روغن‌های آفتابگردان و سویا مقایسه نمودند، نتایج حاکی از این بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره در روغن‌های مذکور از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و BHA بالاتر بوده اما در رقابت با آنتی‌اکسیدان TBHQ ضعیف‌تر عمل کرده است. برا و همکاران (۲۰۰۶)، اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره Ajowan *(Carum copticum)* را در روغن بزرک بررسی و با آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHT، BHA و TBHQ مقایسه نمودند؛ این عصاره فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در روغن بزرک نشان داد که به دلیل حضور تیمول در آن می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های BHT و BHA بیش‌تر بود ولی نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ ضعیف‌تر عمل نموده بود. قادری قهفرخی و همکاران (۱۳۸۹)، میزان ترکیبات فنولی میوه بلوط *(Quercus branti varpersica Lindl.)* را با سامانه‌های مختلف حلال‌هایی مانند متانول (۸۰ درصد)، اتانول (۷۰ درصد) و آب با روش غوطه‌وری بررسی نمودند؛ جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ثبات اکسیداتیو روغن آفتابگردان، غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در سه سطح ۱۰۰۰ و ۵۰۰، ۲۵۰ پی‌پی‌ام با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA، BHT و TBHQ مقایسه شدند؛ نتایج مشخص ساخت عصاره متانولی عملکرد آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به سایر عصاره‌ها داشته است، لیکن نمونه‌ی حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ بیشترین ثبات اکسیداتیو را به خود اختصاص داده است.

نتیجه‌گیری

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل توجهی در منابع گیاهی یافت می‌شوند، اولئوگم رزین کندر نیز سرشار از ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی بالاخص فنول‌ها می‌باشد. نتایج این تحقیق مشخص ساخت که عصاره متانولی اولئوگم رزین کندر از توانایی ضداکسایشی مناسبی در روغن سویا برخوردار بوده، به‌طوری‌که می‌توان کندر را بعنوان منبعی گیاهی و سرشار از ترکیبات زیست فعال دارای آثار آنتی‌اکسیدانی معرفی نمود.

منابع

فاطمی، ح. ۱۳۷۸، شیمی موادغذایی. شرکت سهامی انتشار، چاپ پنجم، تهران، ص ۱۹۱-۱۸۱.

قادری قهفرخی، م.، اعلمی، م.، صادقی ماهونگ، ع. ر.، عزیزی، م. ح.، قربانی، م.، ۱۳۸۹، بررسی اثر استخراج ترکیب‌های فنولی میوه بلوط با حلال‌های مختلف بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در ثبات اکسیداتیو روغن آفتابگردان . فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر

ایران. ۱ :۷۲-۵۹ .

کامکار، ا.، ۱۳۸۸، مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره شوید ایرانی. فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد ۱۵.

مظاهری کلهرودی، م.، بصیری، ع. ر.، جلالی، حسین، ۱۳۹۲، بررسی اثر ضد اکسایشی عصاره دانه رازیانه در روغن سویا و مقایسه آن با ضداکساینده‌های سنتزی . فصلنامه علوم و فناوری‌های نوین غذایی، ۱(۳) :۲۷- ۱۵.

Al-Harrasi A., Al-Saidi S., 2008, Phytochemical Analysis of the Essential Oil from Botanically Certified Oleogum Resin of Boswellia sacra (Omani Luban). *Molecules* 13, 2181-2189.

Akinoso R., Aboaba S., Olayanju T., 2010, Effects of moisture content and heat treatment on peroxide value and oxidative stability of un-refined sesame oil. *African Journal of Food*, Agriculture, Nutrition and Development, 10: 4268-4285.

AOAC. Official methods of analysis., 2003, Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.

AOCS. Official method cd, 19-90., 2009, American oil chemists society, 2-Thiobarbituric acid value, direct method, In official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society.

Arabshahi-Delouee S., Urooj A., 2007, Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. *Food Chemistry* 102, 1233-1240.

Baldioli M., Servili M., Perretti G., Montedoro G.,1996, Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 73, 1589- 1593.

Basar S., Koch A., König W. A ., 2001, Verticillane-Type diterpene from boswellia carterii essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 16, 315-318.

Bera D., Lahiri D., Nag A., 2006, Studies on a natural antioxidant for stabilization of eddible oil and comparison with synthetic antioxidants. *Journal of Food Engineering* 74, 542 – 545.

Blois M. S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26, 1199–1200.

Choe E., Min D. B., 2006, Mechanisms and factors for edible oil oxidation.Comprehensive Reviews in *Food Science and Food Safety* 5,169-186.

Garba S., Andrew K., Justina U., 2013, Antioxidant Activities of total flavonoids extracted from Boswellia papyrifera and Parkia biglobosa . *Topclass Journal of Herbal Medicine* 2,244-247.

Jiang A. L., Wang C. H., 2006, Antioxidant properties of natural components from Salvia plebeia on oxidative stability of ascidian oil.*Process Biochemistry* 41,1111-1114.

Khan, G., Farooqi, M. I. H., 1991, Chemical characterisation of resins sold in Indian Markets. Part I. Luban and Kundur. International. *Journal Pharmacognosy* 29: 302–305.

Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet, J. M., Moutounet M., 1999, Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2719-2723.

Loliger J., 1991,The use of antioxidants in foods. In Free Radicals and Food Additives; Arouma, O. I., Halliwell, B., Eds. Taylor & Francis 1991. 121-150.

Metivier, R.P., Francis, F.J., Clydesdale, F. M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace". *Journal of Food Science* 45, 1099-1100.

Milic B. L., Djilas S. M., Canadanovic-Brunet J. M., 1998, Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry* 61, 443–447.

Mohamed Abdoul-latif F., Obame L. C., Bassolé I. H. N., Hama Dicko M., 2012 , Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of Boswellia sacra Flueck. and Boswellia papyrifera (Del.) Hochst from Djibouti. International Journal of Management, *Modern Sciences and Technologies* 1,1-10.

Mohammadi M., 2013, Evaluation of oxidative quality parameters in imported edible oils in Iran.*British Food Journal* 115, 789-795.

Mohdaly Adel. A. A., 2010, Evaluation of some food processing by-products as sources for natural antioxidants, Process Science, *Institute ofFood Technology and Food Chemistry,* Technical University of Berlin.

Pizarro, C., Esteban-Díez, I., Rodríguez-Tecedor, S., González-Sáiz, J. M., 2013, Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra.*Food Control* 34,158-167.

Prakash B., Singh P., Mishra P. K., Dubey N. K., 2012, Safety assessment of Zanthoxylum alatumRoxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation ofPiper nigrumL . *Fruits International Journal of Food Microbiology* 153:183-191.

Povilaityte V., Venskutonis P.R., 2000, Antioxidative activity of purple peril (Perilla frutescens L.), Moldavian dragonhead (Dracoceph-alum Moldavica L.), and Roman chamomile (Anthemis nobilis L.) extracts in rapeseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77, 951–956.

Siddhuraju P., Becker K., 2003 , Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents

from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (Moringa oleiferea Lam.) leaves. J. Agric. *Food Chemistry* 51, 2144-2155.

Slinkard K., Singleton V. L., 1977, Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods,American *Journal of Enology and Viticulture* 28, 49-55.

Shahidi F., Wanasundara U., 1994 , Stabilization of canola oil by natural antioxidants. In C. T. Ho, & T. G. Hartman (Eds.),Lipids in food flavours (pp. 301–314). Washington, *American Chemical Society*.

Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L., Zhang Y., 2011, Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (Diospyros kaki L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2689-2696.

Tucker A. O., 1986, Frankincense and Myrrh. Economic Botany 40,425-433.

Van Vuuren S. F., Kamatou G. P. P., Viljoen A. M., 2010, Volatile composition and antimicrobial activity of twenty commercial frankincense essential oil samples. *South African Journal of Botany* 76, 686–691.

Wang G., Shi G., Chen F.,Yao R., Wang Z., 2013, loading of free radicals on the functional graphene combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry screening method for the detection of radical- scavenging natural antioxidants. *analytica chimica acta* 802,103-112.

Yang Y., Li Q., Yu X., Chen X., Wang Y., 2013, A novel method for determining peroxide value of edible oils using electrical conductivity. *Food Control* 39, 198-203.

Zhou K., Yu L., 2004, Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. LWT *Food Science and Technology* 37, 717–721.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 477-488

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۸۸-۴۷۷

Antioxidant properties of extract 's*Boswellia Serrata* oleo-gum resin in soyabean oil

Adeleh Mohammadi[1].Saeedeh Arabshahi- Delouee[2*]

Received: 2014.10.30
Accepted: 2015.10.13

Introduction: Frankincense is a natural oleo-gum-resin which is obtained through slits made in the trunks of trees of the genus Boswellia (Family Burseraceae). The genus Boswellia is approximately represented by 43 different trees and shrubs distributed mostly in the India, Arabian peninsula, and east africa (mothana et al.2011). Trees from the genus Boswellia (Burseraceae) are traditionally used as a medicine, a fumigant, in various cosmetic formulations and in aromatherapy in several countries around the world.Frankincense therapeutic effect significantly depends on the amount of oleoresin. These effects include anti-inflammatory, hepatoprotective, anticancerous, anti-HIV, anti-microbial, antifungal, anti-ulcerous, gastroprotective, hypoglycemic andantihyperlipidemic properties (Aman *et al*. 2009; Al-Harrasi and Al-Saidi, 2008; Khadem *et al*. 2009 and Shah *et al*.2009).

Lipids are susceptible to oxidation on storage and frying processes. Characteristic changes associated with oxidative deterioration include development of unpleasant tastes and odors as well as changes in color, specific gravity, viscosity and solubility.Lipid peroxidation is one of the major agents of deterioration for vegetable oils, fats and other food systems (Iqbal and Bhanger, 2007). During oxidation hydroperoxides are formed which again break down to form products like alcohols, aldehydes, ketones and hydrocarbons, which possesses offensive off flavors (Grace Roy et al.2010).In order to inhibit oxidation, synthetic antioxidants, such as BHA (Butylated hydroxyanisole), BHT (Butylated hydroxyanisole) and TBHQ Ter-butyl hydroquinone have been added to foods but there is concern about the use of these compounds due to their reported adverse effects on health. This has led to an increasing trend in the search and replace of these synthetic antioxidants with natural ones such as phenolic compounds (Mariod et al. 2006).Antioxidants affect the process of lipid oxidation at different stages due to differences in their mode of action. Because of the complexity of the oxidation process itself,the diversity of the substrates and the active species involved, the application of different test methods is necessary in the evaluation of antioxidants. The aim ofthisstudy was to evaluatethe antioxidantproperties of various solvent extractsand essential oil offrankincense(*Boswellia serrata)*and evaluation ofitsantioxidant activityinsoybeanoil.

Materials and methods: In this study, the dried powder of *B.serrata* (25g) was extracted overnight in 250 ml each of methanol, ethanol and acetone respectively, in a mechanical shakerat room temperature and each extract was filtered with Whatman No. 1 filter paper. The filtrates obtained from methanol, ethanol and acetone extractions were evaporated at 40 °C in a rotary evaporator.

The content of phenolic compounds was measured by Folin–Ciocalteu, Briefly 20 µl of extract solution were mixed with 1.16 ml distilled water and 100 µl of Folin–Ciocalteu reagent, followed by addition of 300 µl of Na_2CO_3 solution (20%) after 8 minutes. Subsequently, the mixture was incubated at oven at 40 °C for 30 minutes and its absorbance was measured at 760 nm.

The ability of extracts to scavenge DPPH radicals was determined according to the method of Blois (1958). Briefly, 1 ml of a 0.1 mM methanolic solution of DPPH was mixed with 3 ml of extract solution in methanol (containing 100–1000 µg/ml). The mixture was then vortexed and left for 30 min at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 517 nm. The percentageof the DPPH radical scavenging was calculated using the equation given below:

$$\% \text{ inhibition of DPPH radical} = (A_{br} - A_{ar}) / A_{ar} \times 100$$

where A_{br} is the absorbance before reaction and A_{ar} is theabsorbance after reaction has taken place. The molecule 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (a,a-diphenyl-bpicrylhydrazyl DPPH) is characterized as a stable free

1 Former M.Sc. Student of Food Science and Technology,Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran
2 Assistant professor,Department of Food Science and Technology,Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran
(*corresponding author E.mail: saeedeh_arabshahi @yahoo.com)

radical by virtue of the delocalisation of the spare electron over the molecule as a whole, so that the molecule does not dimerize, as would be the case with most other free radicals (Nur Alam et al., 2013).Next, oxidative stabilityand antioxidant activity of methanol extract concentrations (200, 500, 800, 1000 ppm) with the synthetic antioxidant TBHQ (100 ppm) were evaluated in soybean oil without antioxidants (63 ˚C, 12 days).

Results and discussion: The extract significantly ($p \leq 0.05$) suppressed the formation of peroxides and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) during accelerated oxidation, even at a level of 200 ppm. Based on the obtained results, the methanolic extract at 1000 ppm had the highest antioxidant activity among other extracts and inhibits the peroxide value and the index of thiobarbituric acid, but it coulden't compete with the synthetic antioxidant TBHQ. Results showed that, *Boswellia Serrata* was found as a potential source of natural antioxidants due to its marked antioxidant activity.

Key words: *Boswellia serrata* - Phenolic compounds – oxidation- Induction Period - soybean oil

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 489-498

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۹۸-۴۸۹

تعیین خاصیت ضداکسیدانی، محتوای پلی‌فنل کل و شمارش کلی بار میکروبی شیر طعم‌دارحاوی عصاره پوست انار و شهد خرما طی نگهداری در سرما

رؤیا کاظمی زاده[۱]، وجیهه فدائی نوغانی[۲،*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵

چکیده

پوست انار بخش غیرقابل خوردن حاصل از فرآیند آبگیری میوه انارو منبع غنی از تانن‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی دیگر می‌باشد. شهد خرما، نیز طعم و بوی منحصر به فردی دارد؛ و می‌تواند بعنوان شیرین‌کننده طبیعی کاربرد داشته باشد. امروزه، توجه مصرف‌کننده به سوی غذاهای سلامتی بخش معطوف شده است و ترکیبات فنلی موجود در انار و پوست آن می‌توانند چنین نقشی را ایفا کنند؛ علاوه بر آن، دارای خواص ضدباکتریایی بالایی هستند. در این مطالعه، تأثیر افزودن عصاره آبی پوست انار در مقادیر ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد حجمی/ حجمی همراه با شهد خرما در مقادیر ۲، ۴ و ۶ درصد حجمی/ حجمی بر خاصیت ضداکسیدانی، محتوای پلی‌فنل کل و شمار شکلی بار میکروبی شیر طعم‌دار فراسودمند در طول ۲۱ روزنگهداری در سرما مورد بررسی قرار گرفت. برای تولید نمونه‌های شیرطعم‌دار، پیش گرم کردن شیر تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت؛ شهد خرما و عصاره پوست انار به شیر اضافه و به مدت ۵ دقیقه مخلوط شدند؛ سپس، مخلوط در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد. نمونه‌های شیرطعم‌دار فراسودمند، پس از خنک شدن تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بر اساس پژوهش حاضر، با افزودن عصاره پوست انار،فعالیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنل کل افزایش یافتند ($p<0.01$). علاوه بر این، افزودن عصاره پوست انار باعث کاهش شمارش کلی بار میکروبی شیرطعم‌دار شد ($p<0.01$). با افزودن شهد خرما، فعالیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنل کل شیرطعم‌دار افزایش یافت ($p<0.01$).با افزودن مقادیر مختلف شهد خرما، تغییریدر شمارش کلی بار میکروبی نمونه‌های شیر طعم‌دار مشاهده نشد ($p>0.05$).

واژه‌های کلیدی: شیرطعم‌دار، عصاره پوست انار، شهد خرما، خاصیت ضداکسیدانی، شمارش کلی بار میکروبی

مقدمه

محصولات بر پایه شیر مثل نوشیدنی‌های شیر بعنوان مواد غذایی فوق‌العاده با تمام اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری شناخته شده‌اند. علاوه براین، این نوشیدنی‌های سبک، سالم و مغذی هستند؛ اما در قیاس با آب میوه‌ها، اسیدیته کمتری دارند Dalim *et al.,* 2012). بر اساس آمارهای سازمان جهانی غذا و کشاورزی (FAO) ،درایران سرانه مصرفمحصولات مختلف لبنی در مقایسه باکشورهای دیگر بسیار پایین است. بمنظور افزایش مصرف شیر، انواع مختلفی از آن باید تولید شود تا با تأمین سلیقه‌های گروه‌های مختلف مصرف‌کنندگان به افزایش مصرف این دسته از محصولات به ویژه در میان کودکان منجر شود. امروزه، انواع مختلف شیر دردسترس هستند (Dadgostar *et al.,* 2013). شیرطعم‌دار، یک نوشیدنی سالم، مغذی، خوشمزه و رفع‌کننده تشنگی است که توسط گروه زیادی از مردم به‌ویژه کودکان مصرف می‌شود و روز به روز نیاز به یافتن روش‌های متنوعی بمنظور افزایش ارزش غذایی شیر و محصولات آن وجود دارد. تلاش برای پیداکردن شیرین‌کننده‌ای با طعم مطلوب‌تر و کاراتر بمنظور تولید محصولاتی با کیفیت بهتر در حال افزایش است که این امر، در صورت پذیرش توسط مصرف‌کننده محقق خواهد شد (Jothylingam *etal*., 2013).

شهد خرما یا عسل خرما عبارت است از عصاره شیره خرما که مواد کلوئیدی و قسمت عمده مواد رنگی آن جداسازی شده و به صورت یک آبمیوه شیرین، طلایی رنگ با طعمی شبیه کارامل به صورت غلیظ و شبیه عسل در آمده است. میانگین ترکیب شیمیایی شهد خرما با درجه بریکس ۸۲ به‌صورت ۱۶/۵درصد رطوبت، ۱/۴۵درصد پروتئین، ۳۸/۲ درصدگلوکز، ۳۹/۴ درصد فروکتوز و ۱/۶ درصد خاکستر می‌باشد (کشتکاران و همکاران، ۱۳۹۱). مطالعات

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا، ورامین.
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
(* - نویسنده مسئول: Email: vn.fadaei@gmail.com)

مختلفی بمنظور بررسی قابلیت استفاده از شهد خرما بعنوان شیرین‌کننده در تولید فرآورده‌های لبنی نظیر ماست و بستنی انجام شده است: نتایج نشان دادند که ماست غنی شده با شهد خرما، طعم مطلوب‌تر و خاصیت ضداکسیدانی و محتوای مواد معدنی محلول بیشتری در مقایسه با ماست معمولی دارد (Gad *etal.*, 2010). همچنین، با افزایش شیره خرما درفرآورده بستنی، میزان درصد افزایش حجم و گرانروی افزایش و دمای انجماد کاهش می‌یابد و تغییرات نامطلوبی در بررسی حسی بستنی ایجاد نمی‌شود (گوهری اردبیلی و همکاران، ۱۳۸۴)؛ در مطالعه‌ای دیگر، با افزایش عسل خرما، میزان چسبندگی و سختی در نمونه‌های بستنی ماستی پرتقالی افزایش یافت (میلانی و همکاران، ۱۳۹۰).

بازدهی آب میوه انار حدود۳۳۲ لیتر به ازای هر تن میوه انار است؛ محصول جانبی، تفاله انار نامیده می‌شود و حاوی حدود ۷۸ درصد پوست و ۲۲ درصد دانه بر اساس وزن مرطوب است Qu *etal.*, (2010). فعالیت ضداکسیدانی در آبمیوه‌های تجاری حاصل از کل میوه انار نسبت به آبمیوه‌هایی که منحصراً از دانه انار به دست می‌آیند، بالاتر است؛ که آن را می‌توان به محتوای بالای پلی‌فنل‌ها در پوست (مانند تانن‌ها وآنتوسیانین‌ها) نسبت داد. درحال حاضر، ضداکسیدان‌های طبیعی در پزشکی و مواد غذایی بسیار مورد استفاده قرار گرفته‌اند و مصرف‌کنندگان نیز آن‌ها را نسبت به ضداکسیدان‌های سنتزی ترجیح می‌دهند (Wang *et al.*, 2011;Shiban *et al.*, 2012). میوه انار دارای فواید دارویی و سلامت‌بخشی بی‌شماری است که از جمله می‌توان به کاهش فشارخون، جلوگیری از تصلب شرائین و بیماری‌های قلبی، کاهش کلسترول، جلوگیری از بهم پیوستن پلاکت‌های خونی، خواص ضدسرطانی، ضدباکتریایی و ضدویروسی اشاره کرد (Qu *et al.*, 2010). آب انار، منبع مهمی از آنتوسیانین‌ها، ۳-گلوکوزیدها، ۳، ۵- دی گلوکوزیدها، سیانیدین[1]، پلارگونیدین[2]ودلفینیدین[3]محسوب می‌شود. همچنین، حاوی ۱ گرم برلیتر اسید سیتریک، ۷ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و سایر ویتامین‌ها است. Gill و همکاران (۲۰۰۰)، این آبمیوه دارای اثرات پری‌بیوتیکی بوده و باعث رشد باکتری‌های مفید روده می‌شود. اثر پری‌بیوتیکی انار با پری‌بیوتیک‌هایی نظیر اینولین متفاوت است؛ زیرا نه تنها باعث رشد باکتری‌های مفید مانند بیفیدوباکترها و لاکتوباسیلوس‌ها می‌شود، بلکه از طریق برخی از ترکیبات پلی‌فنلی که دارای خواص ضدبیوتیکی هستند، مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زایی مثل باکتری وئیدسوکلستریدیوم نیز می‌گردد (خان بگی دوگاهه و همکاران،۱۳۹۱).ظرفیت ضداکسیدانی پوست انار به دلیل وجود پلی‌فنل‌های محلول در آب، آنتوسیانین‌ها و تانن‌های قابل هیدرولیز می‌باشد (Ibrahium, 2010). همچنین، از آنجا که ضداکسیدان‌های موجود در پوست انار محلول در آب هستند، می‌توان از آب (بعنوان یک حلال سازگار با محیط زیست که براحتی در دسترس است) برای استخراج ضداکسیدان ها از پوست انار بهره جست (Qu *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای، اثر مثبت عصاره پوست انار بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در آب انار مشاهده گردید (خان بگی دوگاهه و همکاران،۱۳۹۱). اثر بازدارندگی عصاره پوست انار بر میکروارگانیسم‌ها در برخی مطالعات به اثبات رسیده است (Ibrahium,2010; Ullah *et al.*,2012; Dahham *et al.*,2010; Khan *et al.*,2011). همچنین، مطالعات نشان دادند که بیشترین خاصیت ضداکسیدانی بین قسمت‌های مختلف انار مربوط به پوست انار می‌باشد (Elfalleh*etal.*,2012).

با توجه به ظرفیت بالای ایران در تولید میوه انار و همچنین، پوست انار به دلیل شرایط آب و هوایی گرمسیری آن و بر اساس گزارش‌های مرکز آمار ایران که در سال ۱۳۸۵ میزان تولید سالانه میوه انار را در ایران حدود ۶۷۰ هزار تن و سهم ایران را در تولید میوه انار در دنیا ۴۷ درصد اعلام کرد (بی نام، ۱۳۸۸) و به دلیل خواص درمانی و سلامت بخشی این زیر فرآورده، تولید شیر طعم‌دار حاوی عصاره پوست انار می‌تواند بعنوان یک نوشیدنی مغذی و سلامتی بخش مورد استفاده قرارگیرد. همچنین، امروزه ایران یکی از صادرکنندگان فرآورده‌های خرما محسوب می‌شود و در نتیجه، استفاده از شهد خرما در این نوشیدنی، هم باعث کاهش مصرف شکر و هم تولید یک نوشیدنی رژیمی خواهد شد. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی خاصیت ضداکسیدانی، محتوای پلی‌فنلی کل و شمارش کلی بار میکروبی شیر طعم‌دار حاوی عصاره پوست انار و شهد خرما می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

شیرخام از شرکت دنیزه (ایران)، شهد خرما با بریکس۸۳ از شرکت دمباز (ایران)، و معرف فولین - سیوکالتو[4]، معرف ۲،۲-دیفنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)[5]و گالیک اسید مونو هیدراته از شرکت سیگما (آمریکا) و محیط کشتPC-AGAR[6] از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی آزمایشگاهی مورد نیاز جهت آزمون‌ها از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید. همچنین، میوه انار رقم دم سیاه شیراز (ایران) مورد استفاده قرار گرفت.

1Cyanidin
2 Pelargonidin
3Delphinidin

4-Folin- Ciocalteu
5- 2,2-Di Phenyl-1-Picryl Hydrazyl
6-Plate count Agar

روش تهیه عصاره آبی پوست انار

میوه‌های انار تازه خریداری، شسته و پوست‌گیری شدند و به مدت یک هفته در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و دور از نور خورشید نگهداری گردیدند. پوست‌های انار خشک شده توسط دستگاه آسیاب مولینکس پودر شدند.۵۰ گرم از پودر پوست انار با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد؛ محلول در یک ظرف شیشه‌ای (که با آلومینیوم پوشیده شده بود) ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی همزده شدو نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت انجام پذیرفت. عصاره پوست انار توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ از تفاله‌ها جدا شد و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه سالم‌سازی و تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خنک گردید. عصاره بدست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

روش تهیه شیر طعم‌دار

شیر خام با چربی ۳/۶درصد وزنی حجمی و ماده خشک بدون چربی ۸/۵ درصد وزنی حجمی از کارخانه دنیزه دریافت گردید. سپس، شیر با درصد چربی ۳ درصد وزنی حجمی استاندارد و تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. عصاره پوست انار و شهد خرما مطابق با جدول ۱ به شیر اضافه شدند و با همزن معمولی به مدت ۵ دقیقه همزده شد. پس از سالم سازی در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، نمونه‌های شیرطعم‌دار در بطری‌های پلاستیکی۲۵۰میلی‌لیتری بسته‌بندی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ارزیابی خاصیت ضداکسیدانی، محتوای پلی‌فنل کل و شمارش کلی بار میکروبی نمونه‌های شیرطعم‌دار در روزهای تولید،۷، ۱۴ و ۲۱ انجام پذیرفت.

جدول ۱- معرفی تیمارهای مورد استفاده در تولید شیر طعم‌دار حاوی عصاره پوست انار و شهد خرما طی نگهداریدر ٤°C

تیمارهاترکیبات	P_1D_1	P_1D_2	P_1D_3	P_2D_1	P_2D_2	P_2D_3	P_3D_1	P_3D_2	P_3D_3
عصاره پوستانار(v/v٪)	۱۰	۱۰	۱۰	۲۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰
شهد خرما(v/v٪)	۲	۴	۶	۲	۴	۶	۲	۴	۶

* P= pomegranate peel extract, D= date date syrup.
P1=10%, P2=20%, P3=30%.
D1=2%, D2=4%, D3=6%.

اندازه‌گیری خاصیت ضداکسیدانی

اثر ضد اکسیدانی نمونه‌های شیرطعم‌دار با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکال (RSA)[1]به کمک معرف DPPH مورد ارزیابی قرارگرفت. خاصیت ضداکسیدانی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری UV[2]طول موج۵۱۷ نانومتر (مدل CARY 50 ، ساخت استرالیا) اندازه‌گیری شد(Elfalleh *et al*., 2012). درصد RSA به وسیله رابطه ذیل محاسبه گردید:

$$\% RSA = [1 - ((A_{Control} - A_{sample}) / A_{Control}) \times 100] \quad (۱)$$

A_{sample} = میزان جذبنمونه

$A_{Control}$ = میزان جذب شاهد

RSA= فعالیت گیرندگی رادیکال‌های DPPH

اندازه‌گیری محتوای پلی‌فنل کل

بمنظور اندازه‌گیری مقدار پلی‌فنل کل از روش معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد. در این آزمایش، جذب نمونه‌هادر طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری UV (مدل CARY 50، ساخت استرالیا) اندازه‌گیری شد (Elfalleh *et al*., 2012). مقدار کل ترکیبات فنولی نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد. مقدار ترکیبات فنولی کل بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم نمونه خشک بیان گردید.

شمارش کلی بار میکروبی

شمارش کلی بار میکروبی با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۵۴۸۴ و در روزهای تولید، هفتم، چهاردهم و بیست‌ویکم انجام پذیرفت. پلیت‌های حاوی نمونه‌ها در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور (مدل ۱۴۳۴zn، ساخت ایران) گرمخانه‌گذاری شدند و پس از این مدت، تعداد کلنی‌ها شمارش شد (بی‌نام، ۱۳۸۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از طرح کاملاً تصادفی برای آزمون‌های خاصیت ضداکسیدانی، محتوای پلی‌فنل‌کل و شمارش کلی بار میکروبی استفاده شد. آزمایش دارای سه فاکتور شامل فاکتور عصاره پوست انار (در سه سطح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد حجمی/ حجمی)، فاکتور شهد خرما (در سه سطح ۲، ۴ و ۶ درصد حجمی/ حجمی) و فاکتور زمان (در چهار سطح روزهای ۰صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱) می‌باشد. برای هر تیمار، ۳ تکرار درنظر گرفته شد.در صورت معنی‌دار شدن تفاوت بین تیمارها، جهت مقایسه میانگین از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ درصد استفاده شد. پس از انجام آزمایش در قالب روش تحقیق و جمع‌آوری داده‌ها،

1Radical Scavenging Activity
2Visible spectrophotometer

آنالیز داده با استفاده از نرم افزار $SAS_{9.1}$ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

خاصیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنل کل نمونه‌های شیرطعم‌دار طی نگهداری در سرما

جداول۱و ۲ به ترتیب تغییرات خاصیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنلی درنمونه های شیر طعم‌دار طی نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهند. با افزایش درصد عصاره پوست انار، خاصیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنلی نمونه‌های شیرطعم‌دار بطور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0.01$). ظرفیت ضداکسیدانی عصاره‌ها به دلیل گروه‌های عملگرای مختلف مانند گروه‌های هیدروکسیلی و کربونیلی است و با افزایش غلظت پلی‌فنل‌ها، خاصیت ضداکسیدانی آن هم افزایش می‌یابد (Elfalleh *et al*., 2012)؛ لازم به‌ذکر است نمونه‌های شیرطعم‌دار دارای محتوای پلی‌فنلی بیشتری نسبت به عصاره پوست انار بودند. می‌توان گفت حرارات دادن نمونه‌های شیرطعم‌دار باعث افزایش محتوای پلی‌فنلی در آن‌ها می‌شود؛ بنابراین، حرارت تأثیر مثبتی بر افزایش محتوای پلی‌فنلی دارد که علت آن، تجزیه پلی‌فنل‌های سنگین وزن به انواع با وزن مولکولی کمتر می‌باشد (جلالی جیوان و همکاران، ۱۳۹۲).

جدول ۲- میانگین خاصیت ضداکسیدانی (درصد فعالیت گیرندگی رادیکال‌های DPPH) نمونه‌های شیرطعم‌دار حاوی عصاره پوست انار (P1:٪۱۰، P2:٪۲۰، P3:٪۳۰)و شهد خرما(D1:٪۲، D2:٪٤، D3:٪٦)طی نگهداریدر ٤°C

روز / تیمار	0	7	14	21
P_1D_1	52.48^{h}	30.19^{d}	29.91^{c}	24.59^{d}
P_1D_2	56.8^{g}	30.94^{c}	30.8^{b}	25.19^{cd}
P_1D_3	59.02^{f}	31.15^{c}	30.93^{b}	25.25^{cd}
P_2D_1	63.78^{e}	32.1^{b}	31.34^{b}	26.16^{c}
P_2D_2	66.2^{d}	31.85^{b}	26.61^{d}	26.42^{c}
P_2D_3	66.91^{i}	31.99^{b}	26.87^{d}	26.87^{c}
P_3D_1	69.85^{c}	34.4^{a}	32.66^{a}	28.63^{b}
P_3D_2	71.9^{b}	34.49^{a}	32.67^{a}	28.69^{b}
P_3D_3	74.72^{a}	34.56^{a}	32.77^{a}	29.04^{b}
میانگین اشتباه استاندارد	2.36	0.31	0.44	2.52

* حروف لاتین متفاوت در هر ستون، نشان دهنده معنی دار بودن میانگین تیمارها می باشد ($p < 0/05$).

جدول ۳ – میانگین محتوای پلی‌فنلی کل (میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم نمونه خشک) نمونه‌های شیرطعم‌دار حاوی عصاره پوست انار (P1:٪۱۰، P2:٪۲۰، P3:٪۳۰)وشهدخرما(D1:٪۲، D2:٪٤، D3:٪٦)طی نگهداریدر ٤°C

روز / تیمار	0	7	14	21
P_1D_1	38.50^{e}	24.38^{f}	24.24^{d}	23.13^{c}
P_1D_2	38.60^{e}	24.54^{ef}	24.44^{cd}	23.2^{c}
P_1D_3	38.78^{e}	24.67^{def}	24.55^{bcd}	23.28^{bc}
P_2D_1	40.25^{d}	24.75^{de}	24.59^{bcd}	23.42^{abc}
P_2D_2	40.42^{cd}	24.93^{cd}	24.74^{abc}	23.48^{abc}
P_2D_3	40.65^{c}	25.13^{bc}	24.84^{ab}	23.58^{ab}
P_3D_1	41.13^{b}	25.24^{ab}	24.96^{a}	23.64^{ab}
P_3D_2	41.42^{b}	25.41^{ab}	24.98^{a}	23.78^{a}
P_3D_3	42.00^{a}	25.55^{a}	24.98^{a}	23.79^{a}
میانگین اشتباه استاندارد	0.24	0.08	0.05	0.05

* حروف لاتین متفاوت در هر ستون، نشان دهنده معنی دار بودن میانگین تیمارها می باشد ($p < 0/05$).

با افزایش درصد شهد خرما، خاصیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنلی نمونه‌های شیرطعم‌دار به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0.01$). شهد خرما منبع خوبی از ضداکسیدان‌ها است که به ترکیبات پلی‌فنلی آن مربوط می‌شود(Gad *et al*.,2010; Al-Mamary *et al*.,2011). بطور کلی، فعالیت ضداکسیدانی در شهد خرما، علاوه بر حضور ترکیبات فنولی، به محصولات واکنش میلارد و محصولات حاصل از کاراملیزاسیون (که بعنوان دهنده الکترون عمل می کنند) نسبت داده می‌شود (Naknean *et al*.,2011).

در طول زمان نگهداری، خاصیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنلی نمونه‌های شیر طعم‌دار بطور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0.01$). کاهش فعالیت ضداکسیدانی نمونه‌ها را می‌توان به خصوصیات انتقالی ترکیبات فنولی نسبت داد (یزدان پناه و همکاران،۱۳۸۸)؛ انتقال آهن یا H_2O_2، ظرفیت ضداکسیدانی ترکیبات فنولی را کاهش می‌دهد (Simic *et al*., 2007). از طرفی، کاهش pH، مقدار ترکیبات فنولی کل را (به دلیل کاهش حلالیت برخی از آن‌ها در شرایط اسیدی و در نتیجه، رسوب آن‌ها) کاهش می‌دهد که در نتیجه آن، خاصیت ضداکسیدانی هم کاهش می‌یابد (جلالی جیوان و همکاران، ۱۳۹۲). از طرف دیگر، با نگهداری نمونه‌های شیرطعم‌دار در سرما، حلالیت ترکیبات فنولی و خواص ضداکسیدانی کاهش می‌یابد (الهامی راد و همکاران، ۱۳۹۲).

جلالی جیوان و همکاران (۱۳۹۲) نیز گزارش کردند که افزایش دمای عصاره هسته خرما باعث افزایش محتوای پلی‌فنلی آن و کاهش pH باعث کاهش محتوای پلی‌فنلی آن می‌شود؛ اما تأثیر افزایش دما بر افزایش محتوای پلی‌فنلی کل نسبت به کاهش pH بیشتر بود. نتایج این پژوهش با نتایج Qu و همکاران (۲۰۱۰) مبنی بر تأیید پوست انار بعنوان منبع غنی از ضداکسیدان‌ها مطابقت دارد. همچنین، تحقیقاتی مبنی بر افزایش خاصیت ضداکسیدانی عصاره پوست انار با افزایش غلظت محتوای پلی‌فنلی نیز نتایج حاضر را تأیید می‌کنند(Shiban *et al*., 2012; Wang *et al*., 2011; Ibrahium, 2010; Al-Rawahi *et al*., 2014). نتایج Gad و همکاران (۲۰۱۰) نیز با نتایج این پژوهش همخوانی دارد؛ آن‌ها گزارش کردند که خاصیت ضداکسیدانی ماست تهیه شده از شهد خرما با افزایش غلظت آن افزایش یافت، ولی خاصیت ضداکسیدانی با افزایش زمان ماندگاری محصول تا ۱۲ روز کمتر شد.

شمارش کلی بار میکروبی نمونه‌های شیرطعم‌دار فراسودمند طی نگهداری در سرما

جدول ۳ تغییرات شمارش کلی بار میکروبی در نمونه‌های شیر طعم‌دار طی نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد را نشان می دهد. شمارش کلی بار میکروبی نمونه‌های شیرطعم‌دار با افزایش درصد عصاره پوست انار کاهش یافت ($p<0.01$). فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست انار ممکن است به علت حضور طیف گسترده‌ای از ترکیبات ضدبیوتیکی باشد که فنل‌ها و تانن‌ها بعنوان مهم‌ترین اجزاء فعال در این زمینه شناسایی شده‌اند. مواد فنولی به همراه پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا، کمپلکس‌های پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند و بدین ترتیب، پس از جذب می‌توانند با آنزیم‌های سلولی (اکسیداز و ردوکتاز) موجود در سیتوپلاسم و دیواره سلولی واکنش دهند؛ از طرف دیگر، این مواد می‌توانند مانع دسترسی میکروارگانیسم‌ها به پذیرنده‌های سطح سلولی شوند (سلاح ورزی و همکاران، ۱۳۹۰). Dahham و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که فنل‌ها، تانن‌ها و فلاونوئیدها، ترکیبات فعال ضدباکتریایی و ضدقارچی در پوست انار هستند و پوست انار در بین قسمت‌های مختلف انار دارای بالاترین خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی است. عصاره پوست انار دارای ترکیبات ضدقارچی فعال از قبیل پونیکالاژین[1]، کاستاگالاژین[2]، گرانات‌ین[3]، کاتچین، گالوکاتاچین[4]، کامپفرول[5] و کوئرستین[6] می‌باشد. واکنش‌های سینرژیستی این ترکیبات، فعالیت ضدقارچی عصاره پوست انار را افزایش می‌دهد (Dahham *et al*., 2010). پونیکالاژین موجود در عصاره پوست انار، اثر بازدارندگی بر فعالیت *کاندیدا آلبیکانس*[7] دارد (Endo *et al*.,2012). همچنین، Ibrahium (۲۰۱۰) در پژوهش خود بیان کرد که پونیکالاژین بخش زیادی از ترکیبات ضداکسیدانی عصاره پوست انار را تشکیل می‌دهد و بیشتر خاصیت ضدمیکروبی پوست انار به این ترکیب مربوط می‌شود. KhanوHanee (۲۰۱۱) گزارش کردند که عصاره اتانولی، متانولی و آبی پوست انار در قیاس با ضدبیوتیک تتراسایکلین[8] دارای قدرت بازدارندگی بیشتری بر *سودوموناس آئروژینوزا*[9] هستند.تانن‌های غنی از الاژیتانین‌ها در اسیدهای فنولی پوست انار دارای فعالیتضدباکتریایی و ضدقارچی هستند؛ این فعالیت ضدباکتریایی ممکن است به دلیل حضور توکسین‌های متابولیکی یا طیف وسیعی از ترکیبات ضدباکتریایی مانند ضدبیوتیک‌ها (که تأثیرات منفی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند) باشد (Khan *et al*., 2011; Bind *et al*., 2014). این ترکیبات فنولی، دیواره سلولی را می‌شکنند، غشاء سیتوپلاسمی را سوراخ وپروتئین‌های غشاء را تخریب می‌کنند؛ در عملکرد آنزیم‌های غشایی اختلال به وجود می‌آورند و باعث مرگ سلول می‌شوند (Ibrahium, 2010).

با افزایش شهد خرما، بار میکروبی در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست و یکم نگهداری افزایش یافت ($p>0.05$). احتمالاً شهد خرما به دلیل داشتن قندهای ساده مونوساکاریدی مانند فروکتوز و گلوکز، شرایط را برای رشد میکروارگانیسم ها فراهم کرده است (میلانی و همکاران،1390؛ Naknean *et al*., 2012).

در طول زمان نگهداری، شمارش کلی بار میکروبی در نمونه‌های شیرطعم‌دار افزایش یافت($p<0.01$)؛ که می توان آن را به کاهش محتوای پلی‌فنلی آن‌ها نسبت داد. اغلب ترکیبات فنولی در حالت

1 Punicalagin
2 Castagalagin
3 Granatin
4 Gallocatechin
5 Kaempferol
6 Querectin
7 *Candida albicans*
8 Tetracycline
9 *Pseudomonas aeruginosa*

پیوند با ترکیبات دیگری مانند پروتئین‌ها هستند و تنها بخش کمی از ترکیبات فنولی به‌صورت آزاد می باشند (Bind *et al*., 2014). بنابراین، می‌توان گفت که خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی آن‌ها محدود می‌باشد. از طرفی، به نظر می‌رسد با کاهش pH و نگهداری نمونه‌ها در سرما قدرت حلالیت ترکیبات پلی‌فنلی کاهش می‌یابد و با رسوب پلی‌فنل‌ها، از قدرت بازدارندگی آن ها در برابر باکتری‌ها کاسته می‌شود (جلالی جیوان و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین، قدرت بازدارندگی با تغییر محتویات فنولی، پیگمان ها و اسید سیتریک تغییر می‌کند (Dahham *et al*.,2010). نتایج این پژوهش با نتایج Pai و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر افزایش قدرت بازدارندگی میکروبی عصاره پوست انار با افزایش غلظت عصاره آبی و الکلی آن مطابقت داشت؛ اثر ضدمیکروبی عصاره پوست انار توسط Nuamsetti و همکاران (۲۰۱۲) نیز تأیید شده است؛ آن‌ها بیان کردند که تأثیر عصاره پوست انار بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. در پژوهش دیگر، سلاح ورزی و همکاران (۱۳۹۰) بیان کردند که پوست میوه انار و بذر آن حاوی مواد فنولی فراوانی است که این ترکیبات هم می‌توانند خواص ضدمیکروبی ایجاد کنند و هم با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، فعالیت ضداکسیدانی بالایی از خود نشان دهند که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

جدول ٤- میانگین شمارش کلی بار میکروبی (cfu/ml) نمونه‌های شیرطعم‌دار حاوی عصاره پوست انار (P1:٪۱۰، P2:٪۲۰، P3:٪۳۰)و شهد خرما (D1:٪۲، D2:٪٤، D3:٪٦)طی نگهداریدر ٤°C

روز / تیمار	0	7	14	21
P_1D_1	0	44000^{a}	94330^{a}	105330^{a}
P_1D_2	0	44700^{a}	96670^{a}	110330^{a}
P_1D_3	0	45000^{a}	96330^{a}	121000^{a}
P_2D_1	0	40300^{ab}	72000^{b}	101670^{b}
P_2D_2	0	40000^{ab}	72670^{b}	107670^{b}
P_2D_3	0	41300^{ab}	72330^{b}	124000^{b}
P_3D_1	0	25000^{c}	57330^{c}	74000^{c}
P_3D_2	0	28000^{c}	59000^{c}	78670^{c}
P_3D_3	0	30000^{c}	59330^{c}	82000^{c}
میانگین اشتباه استاندارد	0	1.53	3.13	4.01

* حروف لاتین متفاوت در هر ستون، نشان دهنده معنی دار بودن میانگین تیمارها می باشد ($p < 0/05$).

نتیجه گیری

امروزه، صنعت غذا از انواع طعم‌ها از قبیل شکلات، عسل، توت فرنگی و... برای بهبود طعم شیر و فرموله کردن انواع مختلف نوشیدنی‌های لبنی به‌منظور تولید محصولات مشتری پسند و سلامتی‌بخش استفاده می‌کند. درحال حاضر، توجه مصرف کننده به سوی غذاهای سلامتی بخش معطوف شده‌است. ترکیبات فنولی موجود در انار و پوست آن می‌توانند چنین نقشی را ایفا کنند؛ علاوه بر آن، پوست انارداراى خواص ضد باکتریایی بالایی است. بطور کلی، بر اساس این پژوهش، با افزایش درصد عصاره پوست انار (۱۰، ۲۰ و ۳۰ ٪v/v)، افزایش میزان فعالیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنلی کل($p<0.01$) و کاهش شمارش کلی بار میکروبی ($p<0.01$) و با افزایش درصد شهد خرما (۲، ۴ و ۶ v/v ٪)، افزایش میزان فعالیت ضداکسیدانی و محتوای پلی‌فنلی کل($p<0.01$) و افزایش شمارش کلی بار میکروبی ($p>0.05$)در نمونه های شیرطعم‌دار مشاهده گردید.

قدردانی

نگارندگان مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از شرکت شیر پاستوریزه دنیزه زنجان به جهت در اختیار قرار دادن امکانات لازم برای انجام این پژوهش اعلام می دارند.

منابع

الهامی راد،ا.،کوشکی،ا.، حداد خدا پرست ،م. و هوشمند دلیر،م.،۱۳۸۹، ارزیابی تأثیر فرمولاسیون‌های ترکیبی از ضداکسیدان‌های طبیعی، سنتزی و اسیدسیتریک در پایدارسازی روغن کره ، مجله‌ی علمی پژوهشی علوم و فنّاوری غذایی،۲ ،۲، ۶۴- ۵۵ .

بی نام، ۱۳۸۱، استاندارد ملی ایران شماره ۵۴۸۴ ، شیر و فرآورده‌های آن- روش شمارش کلی پرگنه‌های میکروارگانیسم‌هادر ۳۰ درجه سلسیوس. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

بی نام،۱۳۸۸ ،کتاب آمار کشاورزی ایران،تهران، ایران. مرکز آمار ایران.

جلالی جیوان،م.،صادقی،س.، مددلو،آ. و یارمند،م.،۱۳۹۲، تأثیر حرارت‌دهی و اسیدی کردن بر مقدار فنل کل و فعالیت ضداکسیدانی عصاره هسته خرما، نشریه پژوهش های صنایع غذایی،۲۳، ۲.۲۳۷- ۲۴۸.

خان بگیدوگاه ه،م.،توفیقی،آ.،خسرویدارانی،ک.،دادگر،م.،مرتضویان،ا.و احمدی،ن.، ۱۳۹۱ ،اثرعصاره پوست انار بر زنده‌مانی باکتریهای پروبیوتیک در آب انار، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران،۵،۷، ۱۷- ۲۴.

سلاح ورزی،ی.، تهرانی فر،ع. و جهانبخش،و.، ۱۳۹۰، ارتباط فعالیت ضداکسیدانی و ضدقارچی عصاره قسمت‌های مختلف انار با محتوای فنولیکی آن، فصلنامۀعلمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران،۱،۲۷، ۴۷- ۵۶.

گوهری اردبیلی،ا.، حبیبی نجفی،م.و حداد خدا پرست،م.،۱۳۸۴ ،بررسی تأثیر جایگزینی شکر با شیره خرما بر ویژگیهای‌فیزیکی و حسی بستنی نرم، پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، ۲، ۱، ۲۳-۳۲.

کشتکاران،م.، محمدی‌فر،م. و اسدی،غ.،۱۳۹۱ ، بررسی اثر دو گونه صمغ کتیرا بر برخی ویژگی‌های رئولوژیک، فیزیکی و حسی نوشیدنی شیرخرما ، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران ،۳ ،۷، ۳۱-۴۲.

میلانی،ا.، بقایی ،ه.و مرتضوی،ع.، ۱۳۹۰ ، اثر جایگزینی عسل، خرما و گوار بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، بافت و ویسکوزیته دسر بستنی ماستی کم چرب پرتقالی، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران،۷ ، ۲،۱۱۵- ۱۲۰.

یزدان‌پناه،ص.،ارجمند،پ.،پورآذرنگ،ه.و محمدی جعفری،م.،۱۳۸۸، بررسی مقاومت حرارتی عصاره ضداکسیدانی پوست خارجی انار در روغن آفتابگردان، علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی،۴۷،۱۳،۹۵- ۱۰۲.

Al-Mamary,M., Al-Habori,M. & Al-Zubairi,A.,2011, The in vitro antioxidant activity of different types of date dates (Phoenix dactylifera) syrups, *Arabian Journal of Chemistry*,1-8 .

Al-Rawahi,A., Edwards,G., Al-Sibani,M., Al-Thani,G., Al-Harrasi,A. & Rahman,M.,2014, Phenolic Constituents of Pomegranate Peels(Punica granatum L.) Cultivated in Oman, *European Journal of Medicinal Plants*, 4,3,315-331.

Bind,A., Singh,S., Prakash,V. & Kumar,M.,2014, Evaluation of Antioxidants through Solid state Fermentation from Pomegranate Peels using Aspergillus niger and it's Antibacterial properties, I*nternational Journal of Pharmacy and Biological Sciences*,4,1, 104-112.

Dahham,S., Ali,M., Tabassum,H. & Khan,M.,2010, Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (Punica granatum L.), American-Eurasian Jurnal. *Agriculture & Environ. Science*, 9,3,273-281.

Dalim, M., Khaskheli, M., Baloch, M., Soomro, A., Khaskheli, G., Mangsi, A. & Barham, G., 2012, Production and Comparison of Banana and Chikoo Flavoured Milk-based Beverages, *Pakistan Journal of Nutrition*, 11, 6, 600-604.

Dadgostar, P. , Jariteh, R., Nateghi, L. & Yousefi, M., 2013, Evaluation and comparison the physicochemical properties of different commercial milk product, *European Journal of Experimental Biology*,3, 5,102-105.

Endo,E.,Ueda-Nakamura,T., Nakamura,C. & Filho,B.,2012, Activity of Spray-dried Microparticles Containing Pomegranate Peel Extract against Candida albicans ,*molecules*, 17, 10094-10107.

Elfalleh,W., Hannachi,H., Tlili,N., Yahia,Y., Nasri,N. & Ferchichi,2012, Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower, *Journal of Medicinal Plants Research* ,6,4724-4730.

Gil,M.,Toma´s-Barbera´n,F., Hess-Pierce,B., Holcroft,M. & Kader,A.,2000, Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing , *Journal of AGRICULTUR. Food Chemistry*,48, 4581-4589.

Gad,A.,kholif,A. & Sayed,A.,2010, Evaluation of the Nutritional value of functional yogurt Resulting From Combination Of Date Date Syrup and skim milk ,*Amirican Journal of Food Technology*,5,4,250-259.

Ibrahium, M., 2010,Efficiency of Pomegranate Peel Extract as Antimicrobial, Antioxidant and Protective Agents, *World Journal of Agricultural Sciences*, 6,4, 338-344.

Jothylingam,S. & Pugazhenthi,T., 2013,development of dietetic herbal flavoured milk and analysis for it's physico chemical properties, *International Journal of Food*,1,3, 54-57.

Khan,J. & Hanee,S.,2011 ,Antibacterial properties of punica granatum peels, *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2,3,23-27.

Naknean,P. & Meenune,M.,2011, Characteristics and antioxidant activity of date sugar syrup produced in Songkhla Province, Southern Thailand, *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 4,4, 204-212.

Nuamsetti,T., Dechayuenyong,P. & Tantipaibulvut,S.,2012, Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils, *ScienceAsia* ,38 ,319–322.

Pai,V., Chanu,T., Chakraborty,R., Raju,B., Lobo,R. & Ballal,M.,2011, Evaluation of the antimicrobial activity of Punica granatum peel against the enteric pathogens: An invitro study ,*Asian Journal of Plant Science and Research*, 1 ,2,57-62.

Qu, W., Pan, Z. & Ma, H., 2010, Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc, *Journal of Food Engineering*, 99, 16–23.

Simić,A., Manojlović,D., Šegan,D. & Todorović,M.,2007, Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics, *Molecules*, 12, 2327-2340.

Shiban, M., Al-Otaibi,M. & Al-Zoreky,N.,2012, Antioxidant Activity of Pomegranate (Punica granatum L.) Fruit Peels,*Food and Nutrition Sciences*, 3, 991-996.

Ullah,N., Ali,J., Khan,F., Khurram,M., Hussain,A., Rahman,I., Rahman,Z.& Shafqatullah,2012, Proximate Composition, Minerals Content, Antibacterial and antifungal Activity Evaluation of Pomegranate (Punica granatum L.) Peels Powder, *Middle-East Journal of Scientific Research* ,11,3, 396-401.

Wang, Z., Pan, Z., Ma, H. & Atungulu ,G., 2011,Extract of Phenolics From Pomegranate Peels, The Open Food *Science Journal*, 5, 17-25.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 489-498

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۹۸-۴۸۹

The determination of antioxidant activity, total polyphenols and microbial total count of functional flavored milk containing pomegranate peel extract and date datesyrup during cold storage

R. Kazemizadeh[1], V. Fadaei Noghani[2*]

Received: 2014.11.09
Accepted: 2015.03.16

Introduction: Flavored milk is a healthy beverage, nutritious, delicious and thirst elimination by a large group of people, especially children consumed. Therefore, the need to find different ways to enhance the nutritional value of milk and its products is of many researchrs' interest.Pomegranate fruits peel is an inedible part obtained during processing of pomegranate juice. Pomegranate peel is a rich source of tannins, flavonoids and other phenolic compounds;which is currentlybeingwidely used in medicine and food industry. Moreover, consumers prefer to use natural antioxidants rather than synthetic ones. The datedatesyrup has unique odor and taste; it has high potential to be a new sweetener which is natural and chemical-free. Datesyrup hasa natural sweetness and is considered easy to digest. Also, it has low fat, no cholesterol and saturated fat and a good source of dietary fiber is considered. In this study, the effect ofaqueous extract of pomegranate peel adding at levels 10%, 20%, 30% and datedatesyrup adding at levels 2%, 4% and 6% on antioxidant property, total polyphenols contents andmicrobial total countof functional flavored milk was investigated during 21-day cold storage.

Materials and method: Raw milk from Deniz factory (Iran), date syrup with Brix ° 83 from Dombaz company (Iran), Reagent Folin - Ciocalteau, reagent 2,2-Di Phenyl-1-Picryl Hydrazyl(DPPH) and gallic acid mono-hydrated from Sigma (America) were prepared. Other laboratory chemicals and PC-AGARCulture media from Merck (Germany) was purchased.Also, pomegranate variety of Shiraz Black Tail (Iran) was used.

Preparation ofAqueous extract of pomegranate peel

Fresh pomegranate was washed and peeled and stored at room temperature away from sunlight for a week. 50gr of powdered pomegranate peelwas mixed with 500 ml of distilled water with temperature of 30°Cand was maintained at 30°C for 12 hours.

Preparation of flavored milk

The milk used for producing functional flavored milk samples was preheated at 50ºC, then date syrup was addedat levels of 2%, 4% and 6% and aqueous extract of pomegranate peel was also added at levels of 10%, 20% and 30% to milk and the whole mixture was mixed for 5 minutes; The mixture was then heated to75ºCfor 15 minutes. After cooling at 25°C, flavored milksamples were refrigeratedat 4ºC.

Determination of antioxidant activity

The antioxidant activityof flavored milk samples was measured according to Elfalleh *et al.* (2012) method using model CARY 50spectrophotometer,Australia, at 517 nm by a Radical Scavenging Activity (RSA) and DPPH reagent .

Determination of total polyphenols

The total polyphenolsof flavored milk samples were measured according to Elfalleh *et al.* (2012) method usingmodel CARY 50spectrophotometer,Australia, at 765 nm by Folin- Ciocalteu reagent. The amount of phenol content was calculated by standard curve of gallic acid .

Microbial total count

Microbialtotal count was determinedin plate count agar according to Iranian National Standard no.5484. Sample plates were incubated in model zn1434incubator, Iran, at 31 ° C for 72 hours.

Experimental design

In this study, A completely randomized design was employed usng SAS software (version 9.1) to determinate the antioxidant activity, total polyphenols and microbial count. The experiment was consisted of

1. Graduated from Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Varamin - Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
2. Department of Food Science & Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: vn.fadaei@gmail.com)

three factors including pomegranate peel extract (in three levels 10, 20 and 30%), date syrup factor (in three levels 2, 4 and 6%) and time (in four days 0, 7, 14 and 21).

Results and Discussion: According to present research, with adding pomegranate peel extract percentage of free radical scavenging and total polyphenols content increased ($p<0.01$).Antioxidant activity is because ofthe existence of functional groups such as hydroxyl and carbonyl groups,with increasing polyphenols, antioxidant activity increased. In addition, temperature has a positive effect on increasing the total polyphenol contentbecause of decomposition of heavy molecular weight polyphenols to lower molecular weight.Furthermore, adding pomegranate peel extract decreased microbial total count of functional flavored milk ($p<0.01$). Phenols, tannins and flavonoids found in pomegranate peel,are anti-bacterial and anti-fungal compounds. With adding date syrup, antioxidant activity and polyphenol content of functional flavored milk increased ($p<0.01$). Antioxidant activity in date syrup is attributed to phenolic compounds, maillard reaction products and the products of caramelization.With adding different amounts of date syrup, there was no different in microbial total count of flavored milk samples ($p>0.05$). During cold storage, free radical scavenging and total polyphenols content decreased ($p<0.01$). cold storage of flavored milk samples and increasing acidity reduced soluble phenolic compounds; so, microbial total count increased during storage.

Key words: Flavored milk, Pomegranate peel extract,Date syrup, antioxidant activity , polyphenol content

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 499-511

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۵۱۱-۴۹۹

ریزپوشانی روغن نعناع (*Menthaspicata*) به روش خشک کردن پاششی

ستاره حسین زاده[۱]، محمدحسین حداد خداپرست[۲]، آرام بستان*[۳]، محبت محبی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۰۱

چکیده

روغن‌های معطر، ترکیبات چربی‌دوست و فرار استخراج شده از گیاهان هستند که به‌عنوان طعم‌دهنده‌های خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این تحقیق ریزپوشانی روغن نعناع به روش خشک‌کردن پاششی و با هدف سهولت در مصرف، قابلیت حل‌شدن در آب و محافظت در برابر عوامل محیطی انجام شد. به این منظور امولسیونی شامل ۲/۵٪ روغن نعناع و ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ وزنی/ وزنی ماده دیواره شامل مالتودکسترین: صمغ‌عربی(۱:۱) آماده، سپس توسط خشک‌کن پاششی با دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. ریزکپسول‌ها تا زمان انجام آزمون‌های کیفی در ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهدای شدند. پایداری امولسیون‌ها با اندازه‌گیری بریکس، اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و رونشینی به مدت ۶ هفته و کیفیت ریزکپسول‌ها با سنجش اندازه ذرات، راندمان ریزپوشانی بر حسب منتول و دی لیمونن، روغن سطحی، روغن کپسول شده، رطوبت، رهایش، نیمه‌عمر در دو دمای مختلف و حلالیت در آب بررسی شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت ماده دیواره در امولسیون، بریکس افزایش، ذرات امولسیون کوچکتر، توزیع اندازه ذرات یکنواخت‌تر و پایداری در برابر رونشینی بیشتر گردید و در ریزکپسول‌ها اندازه ذرات، راندمان ریزپوشانی، روغن کپسول شده نیمه‌عمر افزایش، روغن سطحی، رطوبت و رهایشکاهش یافت. ریزکپسول‌های نگهداری شده در ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به نمونه‌های نگهداری شده در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در طول ۶ هفته نگهداری، زمان رهایش کوتاه‌تر و نیمه‌عمر بیشتری داشتند. کلیه ریزکپسول‌ها در آب به خوبی حل شده، محلولی شفاف ایجاد نمودند.

واژه‌های کلیدی: خشک‌کردن پاششی؛ روغن نعناع؛ ریزپوشانی؛ مالتودکسترین/ صمغ‌عربی

مقدمه

روغنهای معطر از جمله طعم‌دهنده‌های طبیعی استخراج شده از گیاهان هستند که امروزه طرفداران زیادی دارند. روغن‌های گیاهی اکثراً دارای ترکیبات حساس به نور، اکسیژن، رطوبت و حرارت هستند و برای محافظت از آنها نیاز به یک روش مناسب است، تا آنها را از تبخیر و تخریب محافظت نموده و در زمان مناسب آزاد گردند (Badee *et al*., 2012; Teixeira *et al*., 2004). همچنین مصرف، حمل و نقل و نگهداری آنها به شکل مایع به علت حجم بالاییکه اشغال می‌نمایند مقرون به صرفه نبوده و در صورت نشت و یا آسیب رسیدن به ظروف نگهداری با توجه به بالا بودن قیمت آنها خسارت اقتصادی چشم‌گیری به بار می‌آورد.

ریزپوشانی روغن‌های معطر یکی از روش‌های افزایش پایداری، سهولت در نگهداری و حمل ونقل مطمئن آنها است. از جمله روش‌های ریزپوشانی می توان به خشک کردن پاششی، خشک کردن انجمادی، بستر سیال، اکستروژن، هم تافتی، کریستالیزاسیون شدتی، به دام انداختن در لیپوزوم‌ها و کمپلکس ورودی اشاره کرد. از بین انواع روش‌های ریزپوشانی خشک‌کردن پاششی در بسیاری از موارد برای ریزپوشانی مواد معطر در صنایع غذایی ترجیح داده شده است، چراکه به لحاظ اقتصادی، سرعت عمل بالا، اطمینان بالا و قابلیت انعطاف پذیری زیاد، در صنعت به سهولت قابل اجرا می‌باشد (Taylor, 1983;Agnihotri *et al*., 2012; KashappaGoud *et al*., 2005).

روغن برگ گیاه نعناع یکی از انواع روغن‌های معطر گیاهی است که در صنایع غذایی به علت عطر و طعم خاص کاربرد فراوان دارد. گیاه نعناع گونه (*Menthaspicata*) از رده دولپه‌ای‌های پیوسته گلبرگ و سردسته تیره نعناعیان است کهدر اکثر نواحی ایران می‌روید. برگ‌ها بخش معطر و دارویی گیاه را تشکیل می‌دهد که دارای حداقل ۰/۷٪ (حجم/وزن) روغن معطر می‌باشد و دارای خاصیت ضد اسپاسم، ضد نفخ و ضد میکروبی بوده و در درمان ناراحتی‌های گوارشی و همچنین به‌عنوان آرام‌بخش استفاده می‌شود (کمیته تدوین فارماکوپه

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۲ و ۴- استادان گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۳- استادیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم وصنایع غذایی، مشهد.
(* - نویسنده مسئول: Email: a.bostan@rifst.ac.ir)

گیاهی ایران، ۱۳۸۱ Badee *et al*., 2012).روغن نعناع فلفلی را توسط صمغ‌عربی و مالتودکسترین به نسبت ۱:۱ دردمای ۲۰۰°C به روش خشک‌کردن ریزپوشانی نمودند. نتایج آزمون‌های پودرهای حاصل نشان داد، تغییر قابل توجهی در ترکیبات شیمیایی روغن نعناع فلفلی پس از ریزپوشانی ایجاد نشد و مواد معطر در بالاترین سطح تا ۸۱٪ حفظ شده‌اند، Adamiec&Kalemba (۲۰۰۴) در ریزپوشانی روغن نعناع فلفلی به روش خشک‌کردن پاششی دریافتند، راندمان این فرآیند تحت تأثیر مقادیر مختلف مواد اولیه متفاوت بوده اما در کلیه نسبت‌های به‌کار رفته، روغن نعناع با راندمان بالایی حفظ گردیده است. Toure و همکاران (۲۰۱۱) روغن زنجبیل را با مالتودکسترین (DE=۱۸) و پروتئین آب‌پنیر ریزپوشانی نمودند. بهترین شرایط ریزپوشانی در نسبت۱:۱ از مالتودکسترین: آب‌پنیر و فشار هموژنایزر ۳۰ مگاپاسکال و دمای ورودی ۱۲۰°C و خروجی۶۰°C بود. Frascareli و همکاران (۲۰۱۲) روغن قهوه را به روش خشک‌کردن پاششی توسط صمغ عربی ریزپوشانی نمودند. در این تحقیق ریزپوشانی با صمغ عربی در نسبت‌های ۳۰-۱۰ ٪ بررسی گردیده است که بهترین حالت ریز پوشانی در نسبت ۳۰ ٪ بوده است. نجفی و کدخدایی (۱۳۹۰) تأثیر نوع و غلظت ماده دیواره بر ریزپوشانی لیمونن را بررسی نمودند. به این منظور امولسیون روغن درآب حاوی ۱۰٪ لیمونن بر حسب ماده خشک و ۲، ۵، و۱۰٪ کازئینات سدیم و نشاسته اصلاح شده با کمک امواج فراصوت تهیه شد. نتایج نشان داد پودرهای حاوی۱۰٪ نشاسته اصلاح‌شده از قابلیت بالاتری در نگهداری لیمونن برخوردار بوده و در دمای ۲۵°C طی ۶ هفته نیمه‌عمر بیشتری داشتند. در این تحقیق ریزپوشانی روغن نعناع به میزان ۲/۵٪ وزنی/ وزنی با روش خشک‌کردن پاششی با ماده دیوارهای مالتودکسترین: صمغ عربی (۱:۱) به نسبت‌های۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ وزنی/ وزنی انجام شد و تأثیر غلظت‌های مختلف ماده دیواره بر پوشش‌دهی روغن نعناع برای بدست آوردن مناسب‌ترین کیفیت از لحاظ کمترین میزان روغن سطحی، بیشترین درصد روغن ریزپوشانی شده، بیشترین راندمان ریزپوشانی، بالاترین نیمه‌عمر و قابلیت حل شدن ریزکپسول حاصل در آب طی زمان مناسب به کمک آزمون‌های مختلف بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

روغن نعناع به روش تقطیر با آب توسط کلونجر تهیه شد (Mohal khan *et al*.,2012). مالتودکسترین با۲۰-۱۸=DE، از کمپانی Co. Ltd.Xiwang Starch چین تهیه شد. صمغ‌عربی از کمپانیIslandwide corporation فیلیپین تهیه شده است. برای تهیه محلول‌ها از آب یون زدایی شده دوبار تقطیر استفاده شد.

تهیه امولسیون روغن نعناع

مالتودکسترین: صمغ‌عربی (۱:۱) به نسبت وزنی ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ به آب یون‌زدایی شده اضافه گردید. سپس به کمک همزن مغناطیسی همگن شد. فاز آبی برای انجام هیدراتاسیون کامل، به مدت یک شب[1] در دمای۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد (Badee *et al*., 2012;; نجفی و کدخدایی، ۱۳۹۰ ؛ قهرمانی فر و همکاران، ۱۳۸۹؛ Baranauskiene *et al*., 2007). فاز آبی را به دمای محیط رسانده و روغن نعناع را به کلیه نمونه‌ها با نسبت ۲/۵٪ وزنی/ وزنی نسبت به وزن امولسیون افزوده شد. سپس سوسپانسیون فوق توسط همگن ساز اولتراتوراکس (مدلT50، شرکت IKA، آلمان) (Baranauskiene *et al*., 2007 ;Badee *et al*.,2012) با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه همگن گردید. در این مرحله با استفاده از دستگاه مولد امواج فراصوت (مدلHD3200, شرکت BANDELINE,آلمان) با دامنه کنترل[2] ۱۰۰٪ و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت یک دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد همگن‌سازی نهایی انجام گردید. انتقال امواج فراصوت به امولسیون توسط سونوترود مدلTT13 به قطر ۱۳ میلی‌متر انجام شد.

تهیه ریزکپسول

امولسیون‌ها در خشک‌کن پاششی (مدل B190، شرکت BUCHI، کشور سوئیس) در دمای ورودی ۱۰±۱۸۰ و دمای خروجی۱۰±۶۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت پمپ ۱۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و سرعت جریان هوا ۲۰- ۱۵ ٪ معادل۶۰۰ لیتر بر ساعت و فشار ۴ بار خشک گردیدو تا زمان انجام آزمون در ظروف پلاستیکی درب دار در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (صادقیان و همکاران، ۱۳۹۲).

آزمون‌های امولسیون

اندازه‌گیری pH وبریکس

pH امولسیون‌ها با pH متر و بریکس آنها با رفراکتومتر (مدل RX-5000α، شرکت ATAGO، ژاپن) تعیین گردید.

اندازه قطر ذره امولسیون

اندازه قطر ذرات امولسیون با دستگاه سنجش اندازه ذرات (مدل Analysette22، شرکت Fritsch، آلمان)اندازه‌گیری شد (صادقیان و همکاران۱۳۹۲). لازم به ذکراست دستگاه نامبرده Z-Average را گزارش نموده، اما منحنی توزیع اندازه ذرات را بر حسب قطر ذرات امولسیون ترسیم می‌نماید. البته Z-Average با قطر ذرات امولسیون

1Over night
2Amplitude Control

کاملاً متناسب بوده، عبارت است از: قطر میانگین هارمونیک ذرات امولسیون، که از فرمول زیر محاسبه می‌گردد.

$$D_Z = \frac{\sum S_i}{\sum \frac{S_i}{D_i}} \quad (۱)$$

در این فرمول D_i قطر ذرات و S_i شدت پراکنش ذرات است.

عکس‌برداری میکروسکوپی

امولسیون آماده به کمک میکروسکوپنوری (مدلLX400،ساخت شرکت LABOMED، آمریکا) با درشت نمایی ۴۰ روئیت گردید، که قطرات امولسیون تشکیل شده به خوبی قابل مشاهده بودند (صادقیان و همکاران۱۳۹۲).

آزمون رونشینی[1]

۱۵ میلی‌لیتر از امولسیون داخل شیشه مک‌کارتی ریخته شد و به مدت ۶ هفته در دمای۴ سانتی‌گراد نگهداری گردید. در پایان هر هفته، ارتفاع رویه تشکیل شده به ارتفاع کل امولسیون بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و محاسبه شد (Chanamai&Mcclements, 2001).

(۲)(میلی‌متر) ارتفاع مولسیون کل/ (میلی متر)ارتفاع رویه=رویه نشینی

آزمونهای ریزکپسول‌ها

درصد رطوبت

از طریق وزن سنجی تحت خلأ انجام شد. ۱ گرم از ریزکپسول های حاصل از فرآیند ریزپوشانی را در آون با دمای ۱±۷۰ سانتی گراد و خلأ ۱ بار به مدت ۶ ساعت به وزن ثابت رسید(AOAC, 1997).

(۳) ۱۰۰× وزن ریزپوشانی شده (گرم)/ وزن رطوبت (گرم)= محتوی درصد رطوبت

درصد جرمی روغن تام

۱۰گرم ریزکپسول را به مدت ۳ ساعت با استفاده از کلونجر تقطیر نموده، حاصل ضرب حجم روغن بدست آمده بر حسب میلی‌لیتر در دانسیته روغن نعناع که معادل۰/۹۲۵۳ گرم/ میلی‌لیتر می باشد محاسبه گردید، که معادل جرم روغن کل بر حسب گرم می‌باشد (AOAC, 1990).

(۴) ۱۰× (دانسیته روغن × حجم روغن)= درصد جرمی روغن تام

درصد جرمی روغن سطحی

۵ گرم ریز کپسول داخل ارلن مایری که به وزن ثابت رسیده است، توسط ۲۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر شستشو گردید. حلال در ۲۵ درجه سانتی‌گراد توسط روتاری تبخیر گردید. میزان روغن سطحی از طریق اختلاف وزن ارلن مایر قبل و پس از آزمون محاسبه شد(Trubiano&Lacourse, 1988).

(۵) ۲۰× وزن روغن (گرم) = درصد روغن سطحی

درصد جرمی روغن ریزپوشانی شده

خارج قسمت روغن کل به روغن موجود در امولسیون است. روغن موجود در امولسیون بر حسب ماده خشک دیواره محاسبه شد(Frascareli *et al*., 2012).

(۶) روغن موجود در امولسیون/ روغن کل= درصد جرمی روغن ریزپوشانی شده

اندازه ذره

اندازه ذره میکروکپسول با دستگاه سنجش اندازه ذرات (مدل Analysette22، شرکت Fritsch، آلمان) مورد سنجش قرار گرفت. لازم به ذکراست دستگاه نامبرده Z-Average را گزارش می نماید.

تعیین میزان منتول و دی- لیمونن سطحی

تعیین میزان منتول و لیمونن سطحی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدلUV-160A، شرکت SHMADZU، ساخت ژاپن) انجام گردید. برای این منظور روغن موجود در سطح ریزکپسول‌ها با حلال هگزان به ترتیب زیر استخراج گردید. ۱ گرم از پودر با ۲۰ میلی‌گرم هگزان (مناسب برای گاز کروماتوگرافی) در داخل لوله آزمایش درب پیچ دار مخلوط گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه با شیکر مخصوص لوله (مدل basic، شرکتIKA، آلمان) در دمای آزمایشگاه هم‌زده شد. سپس ذرات ریزکپسول ها با کمک کاغذ صافی واتمن ۱ از حلال جدا گردید. محلول باقی مانده توسط بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتر و با هگزان به حجم رسانیده شد. مقدار دی- لیمونن و منتول به ترتیب در طول موج‌های ۲۵۲ و۲۰۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با استفاده از محلول‌های دارای غلظت‌های مختلف از دی- لیمونن و منتول در هگزان ترسیم گردیدو جهت تعیین لیمونن و منتول سطحی از منحنی استاندارد آنها و معادله رگرسیونی مربوطه استفاده شد. از نمونه هگزان برای جلوگیری از خطای جذب در دستگاه استفاده شد (Soottitantawat *et al*., 2003;Sibanda *et al*., 2004).

تعیین میزان منتول ودی- لیمونن داخلی

برای تعیین میزان منتول و دی‌لیمونن باقی‌مانده در ریزکپسول‌ها، از ریزکپسول‌های حاصل از شستشو با هگزان که بر روی کاغذ صافی باقی‌مانده بود استفاده گردید. ۱ گرم از ریزکپسول به ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه داخل لوله درپیچ‌دار منتقل گردید و به مدت ۱ دقیقه با شیکر مخصوص لوله هم‌زده شد. سپس به نمونه هگزان اضافه گردید و به

1 Creaming Test

مدت ۲۰ دقیقه داخل حمام آبی با دمای ۴۵ سانتی‌گراد قرار داده شد. در طول این مدت همزدن به طور متناوب صورت گرفت. پس از طی شدن زمان فوق لوله‌ها در دمای آزمایشگاه سرد شده، سپس توسط سانتریفوژ (مدل Z36HK، شرکتHERMLE، آلمان) با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه جهت جداسازی فاز آبی از حلال سانتریفوژ شدند. در پایان جذب آن اندازه‌گیری شد (Soottitantawat *et al*., 2003; Sibanda *et al*., 2004).

راندمان ریزپوشانی[1]

برای تعیین راندمان ریزپوشانی خارج قسمت مقدار دی- لیمونن یا منتول موجود در ریزکپسول ها به مقدار آنها در امولسیون اولیه بدست آمد. (قهرمانی فر و همکاران ، ۱۳۸۹؛ نجفی و کدخدایی، ۱۳۹۰)

(۷) لیمونن یا منتول در امولسیون (ppm)/ لیمونن یا منتول در میکروکپسول (ppm)= راندمان ریزپوشانی

بررسی رهایش منتول و دی لیمونن و تعیین نیمه عمر

رهایش منتول و دی لیمونن در دماهای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. برای ایجاد شرایط فوق نمونه‌ها در آون ۲۵ و انکوباتور ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و به مدت ۶ هفته و هفته ای یک بار میزان منتول و لیمونن سطحی و داخلی ریزکپسول‌ها اندازه گیری شد. سپس منحنی نیمه لگاریتمی درصد منتول و لیمونن به شکل جداگانه در دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد بر حسب زمان نگهداری ترسیم و با محاسبه شیب هر نمودار (k) زمان نیمه عمر (t ½) هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد.(محاسبه فوق بر اساس معادله مرتبه اول به صورت X=Ka+b انجام می‌شود). لازم به یادآوری است که زمان نیمه‌عمرعبارت از زمان لازم برای کاهش ماده ریزپوشانی شده به میزان ۵۰٪ اولیه می‌باشد که برای محاسبه آن از فرمول زیر استفاده شد;(Krishnan *et al*., 2005، قهرمانی فر و همکاران، ۱۳۸۹).

(۸) $t_{½} = ۰/۶۹۳K$ (نیمه عمر واکنش مرتبه اول)

عکس‌برداری SEM با میکروسکوپ الکترونی روبشی

به‌منظور مشاهده ساختار میکروسکوپی ریزکپسول‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل S360، شرکت OXFORD، انگلستان) استفاده شد. حدود ۱گرم از ریزکپسول‌ها بر روی استاپ آلومینیومی پوشیده‌شده با لایه‌ای از کربن به قطر ۱۲ میلی‌متر پخش‌گردید. شعاعی از الکترون‌های پرشتاب با ولتاژ ۲۰ کیلوولت به نمونه‌ها تابیده شد و تصویر بر اساس شعاع الکترونی برگشتی از نمونه بدست آمد.

بررسی حلالیت

برای حلالیت ریزکپسول‌ها یک محلول ۰/۴٪ وزنی/ حجمی با آب مقطر تهیه شد. زمان انحلال کامل ریزکپسول‌ها از ۵ دقیقه نباید بیشتر باشد. سپس محلول‌ها از لحاظ تشکیل رسوب، رویه بستن، رنگ و شفافیت مورد بررسی قرارگرفت Santos, 2003;Barbosa *et al*., 2005).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های بدست آمده در آزمایشات فوق در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمایش فاکتوریل و با سه تکرار انجام شد. جهت تحلیل واریانس از نرم افزار Minitab 16 استفاده گردید. برای مقایسه میانگین‌ها در تیمارهای مورد بررسی از آزمون Bon froni در سطح ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی خصوصیات امولسیون

تأثیر غلظت ماده دیواره بر اندازه ذرات

جدول ۱ نشان می‌دهد با افزایش غلظت ماده دیواره از ۱۰٪ به۳۰٪ اندازه ذرات از ۳/۳ به ۱/۶ میکرومتر کاهش می‌یابد. یعنی افزایش غلظت دیواره سبب کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) اندازه قطرات امولسیون شده است کوچکتر شدن اندازه ذرات با افزایش غلظت مواد دیواره و بریکس به‌علت تشکیل امولسیون پایدارتر بود، زیرا در این حالت با حداکثر توانایی، محافظت از قطرات در برابر تجمع و بهم چسبیدن را در طی فرآیند ریزپوشانی اعمال می‌نماید (Jafari *et al*., 2007). (نجفی و کدخدایی،۱۳۹۰) به نتایج مشابهی دست یافتند. آنها در ریز پوشانی لیمونن با کازئینات سدیم و نشاسته اصلاح شده به شکل جداگانه که هر کدام در سه سطح ۲٪ ، ۵٪ و ۱۰٪ برای ریزپوشانی لیمونن بکار رفتند، در امولسیون های حاوی ۱۰٪ کازئینات سدیم و ۱۰٪ نشاسته اصلاح شده، اندازه قطرات کوچکتری را گزارش نموده اند.

توزیع اندازه ذرات

شکل ۱منحنی توزیع اندازه ذرات امولسیون‌ها را نشان می‌دهد، که همگی تک قله‌ای هستند و نشان دهنده یکنواختی توزیع اندازه ذرات در تمامی نمونه هاست. اما کشیدگی آنها با یکدیگر تفاوت دارد. با افزایش غلظت مواد دیواره تمایل به کاهش اندازه ذرات افزایش یافته و دارای تغییرات کمتری هستند. به طوری که امولسیون تهیه شده از دیواره با غلظت ۳۰٪ دارای توزیع محدودتر ، باریک‌تر و کشیده‌تر از جهت طولی است. هر چه پهنای منحنی کمتر باشد، دامنه

1Enapsulation Efficiency

تغییرات قطر ذرات امولسیون کمتر و نزدیکی اندازه آنها به یکدیگر بیشتر است. این ویژگی از شاخص‌های حائز اهمیت در تعیین پایداری امولسیون محسوب می‌شود (صادقیان و همکاران۱۳۹۲).

جدول ۱- تأثیر غلظت دیواره براندازه متوسط قطرات امولسیون در سطح ۹۵٪

غلظت ماده دیواره		بریکس امولسیون		pH		Z-Average(µm)
٪۱۰	a	۱۱/۴۵±۰/۰۵	a	۳/۹۴±۰/۰۰	a	۳/۳۷۳۰۰±۰/۲۲۷۶۸
٪۲۰	b	۲۲/۳۹±۰/۰۹	a	۴/۰۲±۰/۰۱	b	۲/۴۵۸۳۳±۰/۱۷۶۷۸
٪۳۰	c	۳۲/۶۵±۰/۲۱	a	۳/۹۶±۰/۰۰	c	۱/۶۲۵۳۳±۰/۲۳۹۰۴۴

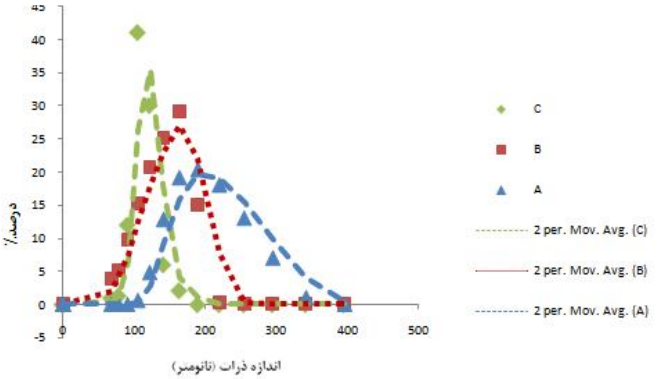
نوع آزمون آماری:Bon froni در سطح ۹۵٪

لذا امولسیون با غلظت۳۰٪ ماده دیواره دارای پایداری بیشتری از سایر امولسیون‌های تهیه شده می باشند (کدخدایی و نجفی،۱۳۹۰). در امولسیون‌های حاوی لیمونن تثبیت شده با کازئینات سدیم با افزایش غلظتماده دیواره، به امولسیون هایی با اندازه ذرات کوچکتر و منحنی توزیع اندازه ذرات باریک‌تر و تیزتر نسبت به امولسیون‌های با درصد مواد دیواره کمتر دست یافتند. (قهرمانی فر و همکاران، ۱۳۸۹) در بررسی اثر هموژنیزاسیون بر ویژگی‌های امولسیونهای تهیه شده با پروتئین آب پنیر، به این نتیجه دست یافتندکه با کاهش اندازه ذرات امولسیون، ظرفیت اتصال آب به قسمت‌های هیدروفیل اسیدهای‌آمینه پروتئین‌های آب پنیر افزایش یافته و سبب افزایش یکنواختی کل سیستم می‌گردد. همچنین با توجه به شاخصی به نام بس‌پاشیدگی[1](PDI) که معیاری از یکنواختی ذرات امولسیون است، کاهش اندازه ذرات سبب بهبود ویژگی‌های امولسیون و کاهش شاخص بس پاشیدگی ذرات امولسیون گردید.

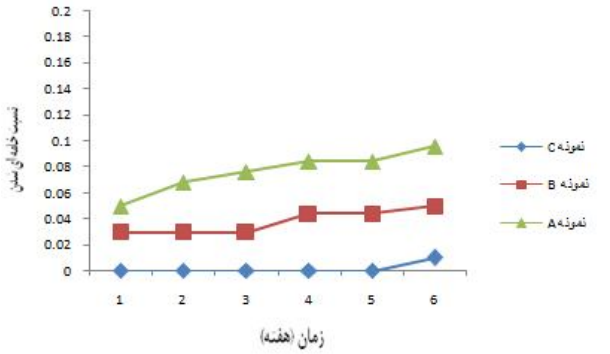
تأثیر غلظت ماده دیواره بر میزان رونشینی

همان‌طور که در شکل۲ نشان داده شده است، امولسیون تهیه شده با ۳۰٪ ماده دیواره تا ۵ هفته کاملاً یکنواخت باقی ماند و پس از آن شروع به دوفاز شدن و تشکیل لایه مرزی نمود. تجزیه واریانس روند خامه‌ای شدن امولسیون در طی ۶ هفته(با توجه به شکل ۲) نشان داد، تأثیر نوع و غلظت دیواره بر پایداری در برابر خامه‌ای شدن معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). با افزایش غلظت، افزایش اثر امولسیفایری و افزایش اثر استابلایزری (قوام) مشاهده شد. عدم پایداری امولسیون‌ها در غلظت‌های پایین تر مواد دیواره را می‌توان به اثر ناشی از ایجاد اتصال بین قطرات در غلظت‌های پایین امولسیفایر (صمغ عربی) نسبت داد. افزایش غلظت مواد دیواره سبب افزایش گرانروی فاز آبی امولسیون گردیده، با توجه به قانون استوکس با افزایش گرانروی، حرکت قطرات به سمت بالا کند شده، سرعت رویه بستن امولسیون کاهش می‌یابد و امولسیون پایدارتری ایجاد می‌شود (Chanamai&Mcclements, 2001).

تصاویر میکروسکوپی امولسیون های تهیه شده که در شکل ۳ آمده است، تأییدی است بر نتایجی که تا کنون بدست آمده است. بطوری که مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت ماده دیواره امولسیون یکنواخت‌تری ایجاد شده است.



شکل ۱- منحنی توزیع اندازه قطرات امولسیون‌ها (A=۱۰٪ ، B= ۲۰٪ ، C= ۳۰٪دیواره)



شکل۲- روند خامه ای شدن امولسیون ها (A=۱۰٪ ، B= ۲۰٪ ، C= ۳۰٪دیواره)

[1]Polydispersity Index (PDI)

(A) (B) (C)

شکل۳- تصاویر میکروسکوپی امولسیون‌ها (A=۱۰٪ ، B= ۲۰٪ ، C= ۳۰٪دیواره)

بررسی خصوصیات ریزکپسول

تأثیر غلظت مادهدیواره بر اندازه ذرات

با توجه به جدول۲ می‌توان مشاهده نمود با افزایش غلظت دیواره از۱۰٪ تا۳۰٪ اندازه ریزکپسول‌ها افزایش یافت. بنابراین هر چه غلظت دیواره بیشتر شود امولسیون حاصل دارای اندازه ذرات کوچکتر و ریزکپسول حاصل اندازه ذره بزرگتری دارد. آنالیز واریانس اندازه ذرات ریزکپسول نشان می‌دهد، بین افزایش غلظت دیواره با افزایش اندازه ذرات ریزکپسول ها ارتباط معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). تحلیل‌های آماری نشان می‌دهد، افزایش غلظت ماده دیواره تا ۲۰٪ بر افزایش اندازه ریزکپسول از لحاظ آماری تأثیر گذار نبوده است، اما از ۲۰٪ تا ۳۰٪ این افزایش متفاوت است. هر چه غلظت دیواره افزایش می‌یابد اتمایزر ذرات را در اندازه بزرگتری خارج نموده، اندازه ریزکپسولهای نهایی بزرگتر می‌شود (Frascareli *et al*., 2012) مشاهده نمودند با افزایش غلظت ماده دیواره اندازه ذره ریزکپسول‌ها بزرگتر می‌شود و با افزایش درصد روغن اندازه ذره ریزکپسول‌هاکوچک تر می‌گردد. این نتیجه توسط (Hogan *et al*., 2001) در ریزپوشانی روغن سویا با کازئینات سدیم و مالتودکسترین نیز مشاهده گردید. بطوری‌که با افزایش غلظت ماده جامد از۱۰٪ به ۴۰٪ اندازه ذرات ریزکپسول‌ها افزایش یافت. این تحقیق توسط اتمایزرهایی که قطر خروجی آنها با هم متفات بود تکرار گردید و در تمام موارد نتیجه فوق بدست آمد.

جدول۲ - تأثیر نوع و غلظت دیواره بر اندازه ریزکپسول ها و راندمان ریزپوشانی در سطح ۹۵٪

غلظت		Z-Average(µm)		راندمان ریزپوشانی برحسب منتول٪		راندمان ریزپوشانی بر حسب لیمونن٪
٪۱۰	b	۱/۰۹۲۶۷±۰/۰۴۲۴۶۳	c	۳۰/۵۹	c	۳۱
٪۲۰	b	۱/۳۴۰۶۷±۰/۰۳۷۶۸۰	b	۵۷/۸۰	b	۵۶
٪۳۰	a	۲/۴۲۹۰۰±۰/۳۰۶۳۲۸	a	۸۹/۶۳	a	۸۷/۴۵

نوع آزمون آماری:Bon froni در سطح ۹۵٪

راندمان ریزپوشانی

بررسی جدول۲ که در آن راندمان ریزپوشانی بر حسب دو ماده از روغن نعناع شامل منتول و دی - لیمونن گزارش شده است نشان میدهد با افزایش درصد دیواره از۱۰٪ به۳۰٪ در ماده دیواره راندمان ریزپوشانی افزایش یافت. راندمان ریزپوشانی برحسب منتول و لیمونن نشان می دهد، با افزایش غلظت دیواره این راندمان به شکل معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). با افزایش غلظت ماده دیواره انتشار روغن به سطح خشک دشوارتر انجام شده و راندمان ریزپوشانی افزایش یافت. همچنین در امولسیون با ذرات بزرگتر، در زمان اسپری شدن توسط اتمایزر ذرات خرد شده و مقداری از مواد هسته آزاد می‌گردد که سبب کاهش راندمان می‌شود در حالی‌که هر چه ذرات امولسیون کوچکتر باشد در هنگام اتمیزه شدن بدون خرد شدن خشک شده و میزان انتقال به سطح کاهش می‌یابد که سبب افزایش راندمان ریزپوشانی می‌گردد (Soottitantawat *et al*., 2003). Frascareli و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده نمودند هر چه غلظت صمغ عربی افزایش یافت راندمان ریزپوشانی روغن قهوه افزایش یافت. همچنین نتیجه گرفتند دو عامل اصلی در تعیین راندمان ریزپوشانی اندازه قطرات امولسیون و غلظت مواد دیوارهاست. نتایج مشابهی توسط Ahn *et al*., 2008) بدست آمد. آنها در ریزپوشانی روغن آفتابگردان با پروتئین ایزوله‌شده شیر و دکسترین دریافتند افزایش غلظت مواد دیواره سبب افزایش ویسکوزیته گردیدهو راندمان ریزپوشانی افزایش یافت.

رطوبت

در جدول۳ نتایج مربوط به اندازه گیری رطوبت ریزکپسول‌ها گزارش شده است. بطوری که ملاحظه می‌گردد، کمترین رطوبت مربوط به ریزکپسول‌های با ۳۰٪ ماده دیواره و بیشترین رطوبت مربوط به ریزکپسول‌های با ۱۰٪ ماده دیواره است. مقایسه

میانگین‌های میزان رطوبت ریزکپسول‌ها نشان می‌دهد بین افزایش غلظت ماده دیواره با کاهش میزان رطوبت ریزکپسول‌ها ارتباط معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). افزایش غلظت دیواره سبب کاهش آب در دسترس جهت تبخیرگردیده و در نتیجه رطوبت در ریزکپسول کاهش می‌یابد. Frascareli و همکاران (۲۰۱۲) در ریزپوشانی روغن قهوه با صمغ عربی مشاهده نمودند با افزایش ماده دیواره از ۲۰٪ به بالا میزان رطوبت ریزکپسول کاهش یافت همچنین Fernandes *et al.*, 2008) در ریزپوشانی روغن گونه‌ای از گیاه به لیمو به نتیجه مشابهی دست یافتند.

درصد جرمی روغن سطحی

روغن سطحی که پس از ریزپوشانی در سطح ریزکپسول باقی می‌ماند به راحتی اکسید شده و منجر به تولید ترکیبات نامطلوبی می‌گردد از طرفی هر چه مقدار روغن سطحی کمتر باشد، ریزکپسول حاصل از کیفیت بالاتری برخوردار است. مشاهده جدول ۳ نشان می‌دهد با افزایش درصد ماده دیواره از ۱۰٪ به ۳۰٪ ، مقدار روغن سطحی در ریزکپسول از ۰/۱۴ به ۰/۰۱ کاهش یافت. مقایسه میانگین‌های روغن سطحی نشان می‌دهد، با افزایش غلظت ماده دیواره از ۱۰٪ به ۳۰٪ میزان روغن سطحی به شکل معنی‌داری($P<۰/۰۵$) کاهش یافت. (Soottitantawat *et al.*, 2005,2003) در ریزپوشانی لیمونن با مواد دیواره مختلف شامل صمغ‌عربی، مالتودکسترین: صمغ‌عربی و نشاسته اصلاح‌شده با استفاده ازخشک‌کن پاششی به نتایج مشابهی رسیدند. آنها بیان نمودند با کاهش اندازه ذرات امولسیون، روغن سطحی در ریزکپسول‌ها کاهش یافت. در حالی‌که هر چه اندازه ذرات امولسیون بزرگتر شود به‌علت تخریب و شکسته شدن آسان تر آنها در اتمایزر، روغن سطحی در ریزکپسول‌ها افزایش یافت. (قهرمانی فر و همکاران در سال ۱۳۸۹) در ریزپوشانی لیمونن با پروتئین آب‌پنیر به این نتیجه رسیدند که با افزایش غلظت ماده دیواره از ۱۰٪ به ۳۰٪ روغن سطحی از ۳/۸۵٪ به ۱/۶۱٪ کاهش یافت، که علت این امر را ناشی از افزایش پایداری امولسیون و جلوگیری از خردشدن ذرات و آزاد شدن ترکیبات فرار هسته در طول اتمیزاسیون توسط خشک‌کن پاششی عنوان نموده‌اند.

درصد جرمی روغن کپسول شده

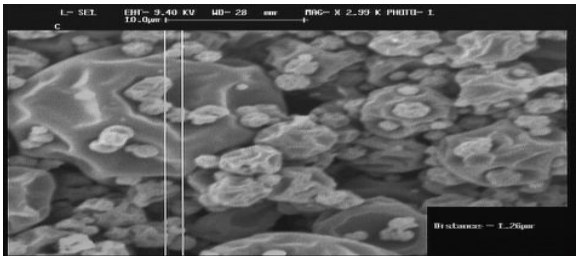
نتایج اندازه‌گیری درصد جرمی روغن کپسول شده که در جدول۳ بیان گردیده نشان می‌دهد با افزایش غلظت ماده دیواره از ۱۰٪ به ۳۰٪ میزان روغن کپسول شده افزایش یافت و این افزایش از ۴۸/۱٪ تا ۹۲/۵٪ بود. نتایج فوق را می‌توان به خواص امولسیون نسبت داد. هر چه در امولسیون غلظت مواد دیواره بالاتر باشد به زمان کوتاه تری برای تشکیل پوسته نیاز دارد، در نتیجه حرکات چرخشی قطرات کاهش یافته و به حفظ بیشتر آنها کمک می‌کند (Jafari *et al.*, 2008) آنالیز واریانس روغن کپسول شده در ریز کپسول‌ها نشان داد که بین میزان روغن کپسول شده با غلظت و نوع دیواره، رابطه معنی‌داری برقرار است ($P<۰/۰۵$). هر چه غلظت دیواره کمتر باشداندازه ذرات امولسیون ها بزرگتر شدهودر زمان خشک شدن مقدار روغن سطحی افزایش می‌یابد. در این شرایط میزان تبخیر روغن از سطح افزایش یافته و میزان روغن کپسول شده کاهش می‌یابد. (*et al.*, 2012Frascreli) در ریزپوشانی روغن قهوه با صمغ عربی به نتایج مشابهی رسیدند. آنها دریافتند که بیشترین مقدار روغن کپسول شده مربوط به بیشترین غلظت ماده دیواره (۳۰٪) بوده و کمترین روغن ریزپوشانی شده مربوط به کمترین غلظت از مواد دیواره (۱۰٪) می‌باشد.

به‌منظور اطلاع از چگونگی ساختار ریزکپسول‌ها، تصویری از آنچه توسط میکروسکوپ الکترونی در غلظت ۳۰٪ ماده دیواره روئیت شد در شکل ۴ آمده است.

جدول ۳- تأثیر نوع و غلظت دیواره بررطوبت، روغن سطحی و روغن کپسول شده در سطح ۹۵٪

غلظت	رطوبت٪		روغن تام	روغن سطحی٪		روغن کپسول شده٪	
٪۱۰	a	۲/۰۹۶۶±۰/۰۵۶۹	۱۲/۰۲۶۷±۰/۰۱۲۰	a	۰/۱۴۶۶۶۷±۰/۰۰۳۳۳۳	c	۴۸/۱۰۶۷±۰/۰۴۸۰
٪۲۰	b	۱/۵۳۳۳±۰/۱۵۰۷	۹/۲۵۰۰±۰/۰۰۰۰	b	۰/۱۳۰۰۰۰±۰/۰۰۰۰۰۰	b	۷۴/۰۰۰۰±۰/۰۰۰۰
٪۳۰	c	۰/۸۱۳۳±۰/۱۵۶۷	۷/۷۱۱۰±۰/۱۹۸۵	c	۰/۰۱۳۳۳۳±۰/۰۰۳۳۳۳	a	۹۲/۵۶۳۳±۲/۳۸۳۹

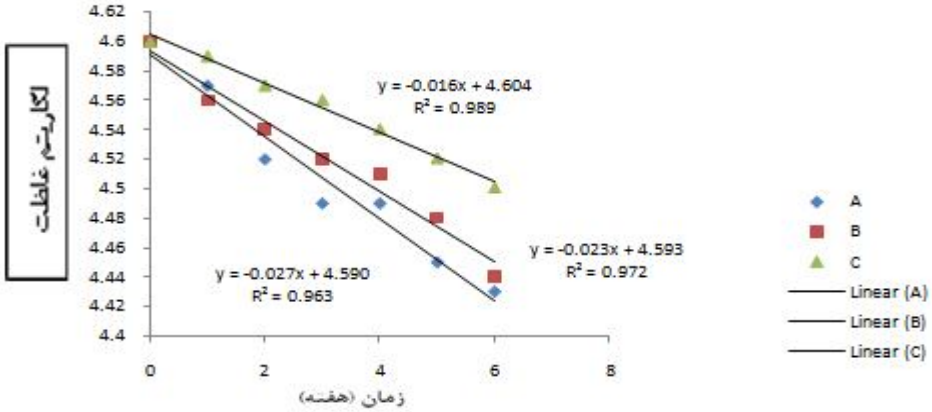
نوع آزمون آماری:Bon froni در سطح ۹۵٪



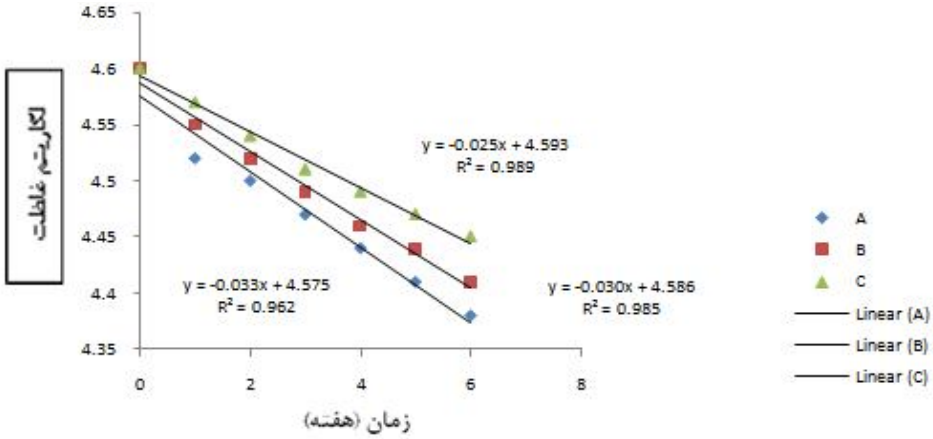
شکل٤- تصویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونیمربوط به غلظت ۳۰٪ ماده دیواره

رهایش و نیمه عمر

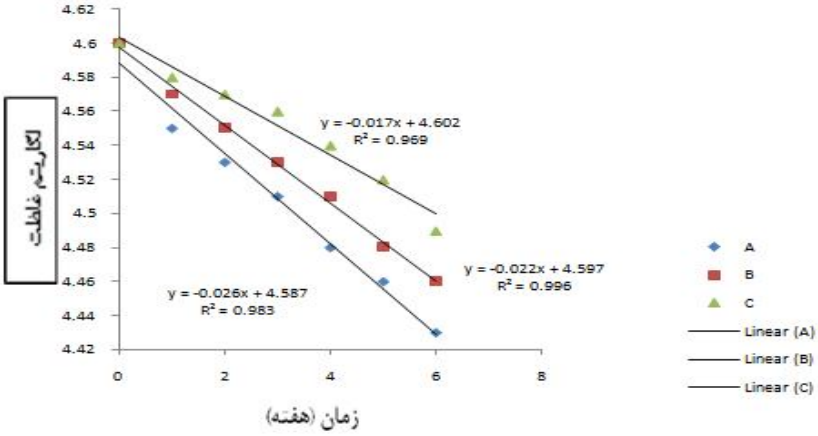
نتایج حاصل ازرهایش منتول و دی- لیمونن کـه از مـواد مـوثره روغن نعناع می باشند نشان‌دهنده روند کاهش هریک از این ترکیبات در دماهای مذکور بر حسب زمان در منحنی های چهارگانه الـف و ب آمده است. چنانچه ملاحظه می‌شود کلیه منحنی‌ها (منحنـی تغییـرات لگاریتم غلظت بر حسب زمان) خطی و نزولی هستندکه بیانگر پیـروی میزان افت منتـول و دی لیمـونن از مکـانیزم واکـنش درجـه اول بـا ضریب تبیین از ۰/۹۶ می باشد.



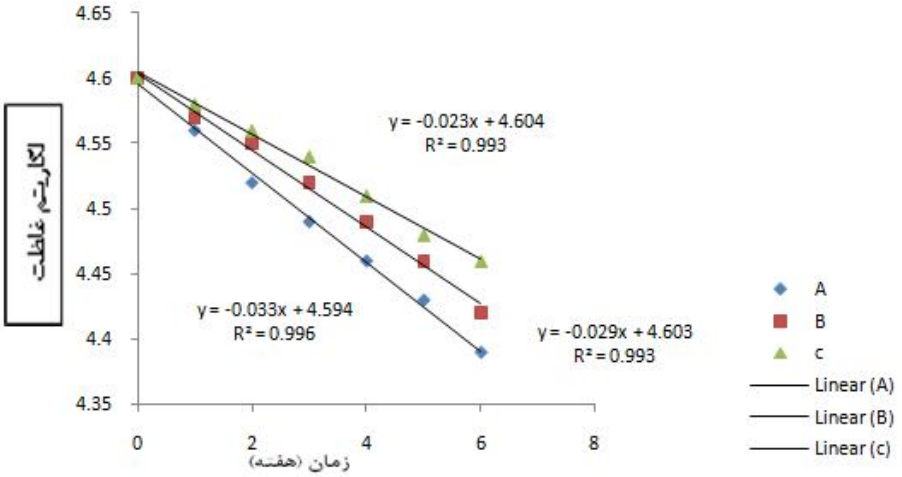
شکل۵- رهایش دی- لیمونن در ٤ درجه سانتی‌گراد (A=۱۰٪ ، B= ۲۰٪ ، C= ۳۰٪ دیواره)



شکل٦- رهایش دی- لیمونن در ۲۵ درجه سانتی‌گراد (A=۱۰٪ ، B= ۲۰٪ ، C= ۳۰٪ دیواره)



شکل۷- رهایش منتول در ٤ درجه سانتی‌گراد (A=۱۰٪ ، B= ۲۰٪ ، C= ۳۰٪ دیواره)



شکل۸- رهایش منتول در ۲۵ درجه سانتی‌گراد (A=۱۰٪ ، B= ۲۰٪ ، C= ۳۰٪ دیواره)

لذا با توجه به ضرایب بدست آمده برای خطوط برازش شده بر داده‌های آزمایش می توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مدل مرتبه اولاستفاده شده برای نشان دادن روند کاهش منتول و دی- لیمونن از ریزکپسول‌ها مناسب است. بر اساس مکانیزم واکنش درجه اول، نیمه عمر منتول و دی- لیمونن با توجه به ثابت سرعت (شیب) معادلات رگرسیونی بدست آمده از هر منحنی محاسبه گردید(جدول۴). داده‌ها نشان داد میزان از دست رفتن منتول و لیمونن به صورت قابل ملاحظه‌ای به غلظت مواد دیواره بستگی دارد. همچنین استفاده از غلظت‌های بالاتر مواد دیواره، موجب ابقای بیشتر مواد موثره و کاهش روند خروج آنها از ریزکپسول‌ها گردید. به‌طوری که میانگین نیمه عمر ریزکپسول باغلظت ۳۰٪ ماده دیواره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به میزان۸۷ روز بیش از ریزکپسول نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. بنابراین کاهش دما از ۲۵ به ۴ درجه سانتی‌گراد،۸۷ روز بر ماندگاری ریزکپسول افزود. افزایش زمان نیمه‌عمر ریزکپسول با افزایش غلظت ماده دیواره بدین سبب است که، همزمان با افزایش غلظت دیواره اندازه ریزکپسول‌ها افزایش یافته و میزان سطح به حجم در آنها کاهش می‌یابد. بنابراین میزان آزادسازی ترکیبات هسته با بزرگتر شدن اندازه ذرات ریزکپسول‌ها کاهش می‌یابد. Soottitantawat و همکاران (۲۰۰۵) به نتاج مشابهی دست یافتند. آنها در ریزپوشانی لیمونن با نشاسته اصلاح‌شده و مالتودکسترین: صمغ‌عربی ملاحظه نمودند که میزان رهایش در ریزکپسول‌های کوچکتر که حاوی درصد کمتری از مواد دیواره هستند بیش از ریزکپسول‌های بزرگتر بوده که حاوی مواد دیواره بیشتری هستند. که با نتایج به دست آمده از این تحقیق نیز هماهنگی دارد.

جدول ٤- تأثیر غلظت ماده دیواره بر ماندگاری ریزکپسول ها در ٤ و ۲۵ درجه سانتی گراد در سطح ۹۵٪

غلظت	نیمه عمربرحسب منتول در دمای٤°c(روز)	نیمه عمر برحسب منتول در دمای۲۵°c(روز)	نیمه عمر برحسب لیمونن در دمای٤°c(روز)	نیمه عمر برحسب لیمونن در دمای۲۵°c(روز)
٪۱۰	۱۸۳/۷	۱۴۳	۱۷۳/۸	۱۴۴/۳
٪۲۰	۲۱۱/۸	۱۶۵/۵	۲۰۲/۹	۱۵۹/۵
٪۳۰	۲۸۳/۶	۲۰۲/۹	۲۸۸/۷	۱۹۴

بررسی حلالیت

روغن نعناع در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه در آب به‌عنوان حلال حل نگردید در حالی که کلیه نمونه‌های مربوط به روغن نعناع ریزپوشانی شده، در مدت ۱/۵ دقیقه به طور کامل در آب حل گردیدهوکاملاً شفاف و فاقد هر گونه رسوبی بودند.

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد، در ریزپوشانی روغن نعناع به میزان ثابت ۲/۵٪، غلظت ماده دیواره بر پایداری امولسیون، راندمان ریزپوشانی و باقی ماندن منتول و دی لیمونن در ریزکپسول در زمان خشک کردن و در دوره نگهداری مؤثر بودند. به‌طوریکه با افزایش غلظت ماده دیواره از ۱۰٪ تا ۳۰٪، امولسیون پایدارتر و ریزکپسول هایبا روغن سطحی کمتر، راندمان ریزپوشانی بالاتر و نیمه‌عمر بیشتر بدست آمد. همچنین دمای نگهداری نیز نقش مهمی در محافظت از ترکیبات فرار داشت به‌طوریکه ریزکپسول‌های نگهداری شده در دمای ۴°C میانگین نیمه‌عمرشان بیش از نمونه‌های

نگهداری شده در ۲۵°C بود. با توجه به اینکه مالتودکسترین ترکیبی هیدروفیل و غیریونی است و صمغ عربی دارای ساختار دوگانه هیدروفیل و هیدروفوب است، از نتایج بدست آمده از این ریزپوشانی بویژه نیمه عمربدست آمده برای ریزکپسول‌ها می‌توان دریافت ترکیب این دو ماده دیواره توانسته است پوشش مناسبی برای روغن نعناع ایجاد نماید.

منابع

صادقیان، ع. ۱۳۹۲.بررسی تأثیر برهم کنش‌های بین مولکولی بر ویژگی‌های امولسیون و ریزکپسول روغن هل. پایان نامه دوره دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد.

قهرمانی‌فر، ا.، محمدی‌ثانی، ع.، نجفی، م.، قهرمانی‌فر، م. ۱۳۸۹. تأثیر ویژگی‌های امولسیون بر خصوصیات پودرهای حاصل از فرآیند ریزپوشانی. مجله علمی و پژوهشی علوم و فناوری غذایی ،۲ (۲): ۴۵-۵۴.

قهرمانی فر، ا.، محمدی‌ثانی، ع.، نجفی، م.، محمدی مقدم، ت. ۱۳۸۹. بررسی تأثیر پارامترهای زمان هموژنیزاسیون و غلظت بر ویژگی‌های امولسیون کنندگی پروتئین آب پنیر تغلیظ شده. مجله علمی و پژوهشی علوم و فناوری غذایی، ۲ (۲): ۳۵-۴۳.

نجفی، م.، کدخدایی، ر. ۱۳۹۰. ریزپوشانی لیمونن به روش خشک‌کردن انجمادی. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۷ (۳): ۲۱۰-۲۱۷.

کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران. ۱۳۸۱. فارماکوپه گیاهی ایران. چاپ اول. تهران. وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی.

Adamiec, J., Kalemba, D. 2004.Microencapsulation of peppermint oil during spray-drying.*International Drying Symposium*, B (4): 1510-1517.

Agnihotri, N., Ravinesh, M., Chirag, G., Manu, A. 2012.Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (1): 1-20.

Ahn, J., Kim, Y., Lee, Y., Seo, E., Lee, K., Kim, H.2008.Optimization of microencapsulation of seed oil by responsesurface methodology. *Food chemistry*, 107 (1): 98–105.

AOAC, 1997. Official Methods of Analysis, 16th ed. 3rd rev. *Association of Official Analytical*

AOAC, 1990.Volatile oil in spices. In Official Methods of Analysis,15th ed. Helrich, K., Ed.,: Arlington, VA, 1001.

Badee, A., Amal, E., El- Kader, A., and Hanan, M. Aly. 2012. Microencapsulation Of Peppermint Oil By Spray Drying. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(12): 499-504.

Baranauskiene, R., Bylaite, E., Zukauskaite, J., and Venskutonis, P. 2007. Flavour Retention of Peppermint Essential Oil Spray-Dried in Modified Starches during Encapsulation and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (8): 3027-3036.

Barbosa, M., Borsarelli, C., &Mercadante, A. 2005. Light Stability of Spray-Dried Bixin Encapsulated with Different Edible Polysaccharide Preparations. *Food Research International*, 38: 989-994.

Chanamai, R., &Mcclements, D. 2001. Comparison of Gum Arabic, Modified Starch, and Whey Protein Isolate as Emulsifiers: Influence of pH, CaCl2 and Temperature. *Journal of Food Science*, 67 (1): 120-125.

Chanamai, R., &Mcclements, D. 2001.Depletion Flocculation of Beverage Emulsionsby Gum Arabic and Modified Starch.*Journal of Food Science*, 66 (3): 457-463.

Fernandes, L., Turatti, I., Lopes, N., Ferreira, J., Candido, R., Oliveira, W., 2008.Volatile retention and antifungalproperties of spray-dried microparticles of Lippiasidoidesessential oil.*Drying Technology*. 26 (12): 1534–1542.

Frascareli, E., Silvaa, V., Tonona. R., Hubingera, M. 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying.*Food and Bioproducts Processing*, 90: 413-424.

Hogan, S., Mcnamee, B., O'Riordan, E., O'Sullivan, M. 2001.Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbhydrate blends.International *Dairy Journal*,11 (3): 137–144.

Jafari, S.M., He, T., Bhandari, B. 2007.Encapsulation of nanoparticles of D-limoneneby spray drying: Role ofemulsifiers and emulsifying techniques. *Drying Technology*, 25: 1079–1089.

Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., 2008b.Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying.*Drying Technology*, 26 (7): 816–835.

KashappaGoud, H., Desai and Hyun, J. 2005.Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23 (1): 1361-1394.

Krishnan, S. Kshirsagar, A. Singhal, R. 2005.The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. Food and Fermentation Technology Department, Institute of chemical Technology, University of Mumbai.*Carbohydrate Polymers*, 62 (4): 309–315.

Mohal Khan, A., Khatun, S., Hossain, M., and Rahman,M. 2012. Characterization Of The Eucalyptus (E.Globulus) Leaves Oil. *Journal of Bangladesh Chemical Society*, 25 (2): 97-100.

Santos, A. 2003. Encapsulation of oleoresin of paprica by gum arabic and aglomerationprosses with amino/gelatin:

stabilation and application Ph.D. *Thesis*, 1–171.
Sibanda, W., Pillay, V., Danckwerts, M., Viljoen, A., van Vuuren, S. & Khan, R. 2004. Experimentaldesign for the formulation and optimization of novel Cross-linked ilispheres developed for in vitro site-specificrelease of menthapiperita oil. AAPS *Pharm Science Technology*, 5 (1): 1-14.
Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohgawara, M., &Linko, P. 2003. Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size the retention of volatile Compounds. *Journal of Food Science*, 68: 2256– 2262.
Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara,M., Linko, P. 2005. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d-limonene by spray drying .*InnovativeFood Science of Emerging Technolog*, 6 (1): 107–114.
Taylor, A. 1983.Encapsulation systems and their applications in the flavorindustry.*Food Flavor Ingredients Packaging and Processing*. 5 (9),48–51.
Teixeira, M., Andrade, L., Farina, M., & Rocha-Leao, M. 2004.Characterization of short Chain fattyacid microcapsules produced by spray drying.*Materials Science and Engineering*, 24: 653-658.
Toure, A., Bo Lu, H., Zhang, X., Xueming. X. 2011. Microencapsulation of GingerOil in 18DE Maltodextrin/Whey Protein Isolate. China.Journalof Herbs, *Spices & Medicinal Plants*, 17 (2): 183-195.
Trubiano, P., &Lacourse , N. 1988. Emulsion-stabilizing starches.flavour encapsulation, 370: 45-54.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 499-511

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۵۱۱-۴۹۹

Microencapsulation of Spearmint (*MenthaSpicata*) Oil using spray drying Method

S. Hosseinzadeh[1], M. H. Hddad Khodaparast[2], A. Bostan[3*], M. Mohebbi

Received: 2014.12.19
Accepted: 2015.07.23

Introduction: Flavor plays a pivotal role in consumer satisfaction and further consumption of foods. Most available aroma compounds are synthetic and most of consumers tend to avoid them as they are of the idea that the chemical flavors are toxic or detrimental to their health. Recently, the market of flavors from natural sources is shifting its focus on application rather than synthetic flavors (Badee et al, 2012). Essential oils consist of sensitive compounds against environmental effects. Microencapsulation is one of the methods which increases the stability of essential oils and flavors during storage and transportation. Different methods which may be used for microencapsulation include spray drying, spray-cooling, spray-chilling, coaservation, extrusion, fluidized bed method (KashappaGoud et al, 2003). However, spray drying method is preferred due to its high speed, high reliability, high flexibility and its being economical and the fact that it can be easily implemented in industry (KashappaGoud et al, 2003). Spray drying of essential oils requires homogenizer, spray dryer and chemical materials used for walls such as some types of emulsifiers and ingredients including maltodextrin, dried corn syrup, gum Arabic, gelatin and milk protein (Adamiec&Kalemba, 2004; Badee et al, 2012). Arabic gum (acacia gum) is a biopolymer which is derived from internal sap of acacia tree. It consists of a heteropolysaccharide complex with highly ramified structure (Phisut, 2012). It is an effective emulsifier for flavor emulsions thanks to its high water solubility, low solution viscosity, good surface activity, and ability to form a protective film around emulsion droplets (Chanamai&Mcclements, 2001). Maltodextrins are products of starch hydrolysis, consisting of D-glucose units linked mainly by α(1→4) glycosidic bonds. They are described by their dextrose equivalence (DE) which is inversely related to their average molecular weight. The greater the DE is, the shorter the glucose chains are and the more water they absorb (Phisut, 2012).

Materials and method: Spearmint oil was produced by clevenger distillation from spearmint leaves (Mohal Khan et al, 2012). Malthodextrin with DE=18-20 from Xiwang Starch Co. Ltd., China, has a sweet taste and it is used in combination with emulsifiers, creates the walls and covers and causes thermal resistance and resistance to browning. Solubility in water=min 98%, moisture=4.5-6%, pH=4.5-6.5 and ash=max 0.1%. Arabic gum was prepared from Slandwide Corporation Co., Philippines, which is used as an emulsifier, stabilizer and the cover (moisture = max 10%, ash=max4% and pH =4-5).In making an emulsion, deionized double distilled water was used.

A Solution of maltodextrin/arabic gum (1:1) in ratios of 10%, 20% and 30% in deionized water were prepared at 45°C and 1200 rpm for 1h (by Stirrer IKA). The solution was kept in cool room temperature at 4°C overnight (Badee et al, 2012; Baranauskiene et al, 2007). Then, 2.5% spearmint oil was added to an aqueous and homogenized (15000 rpm for 10 min) solution with an Ultra Turrax (model T25 digital, IKA Co, Germany) (Badee et al, 2012; Baranauskiene et al, 2007; Baranauskiene&Venskutonis, 2009; Frascareli et al, 2012). Then sonificasion (model ,HD3200, BANDELINE Co, Germany) for 1 minute by amplitude control 100%, frequency 20 kHz at 45 °C. The emulsion was spray dried in a BUCHI B-190 spray dryer (Badee et al, 2012; Baranauskiene et al, 2007; Baranauskiene&Venskutonis, 2009) where the inlet temperature was 180 °C, outlet temperature 60°C, pump speed 10 ml/min, air flow 600 l/h and pressure 4 bar. The powder was stored at -18°C until tested.

Results and Discussion: The results of this research showed that during microencapsulation of spearmint oil at the fixed rate of 2.5%, wall concentration were effective in the stability of emulsions and in keeping menthol and d-limonene in microcapsule during drying and storage. By increasing wall material from 10% to 30% the most stability in emulsion was obtained and more half life and less release in microcapsules was

1 MSc. Student, Department of Food Science and Thechnology, Ferdowsi University. Mashhad. Iran.
2 and 4- Professors, Department of Food Science and Thechnology, Ferdowsi University. Mashhad. Iran.
3- Assistant Professor, Food Nanotechnology Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.
(*Corresponding Author Email: a.bostan@rifst.ac.ir)

achieved. Also, temperature plays an important role in protecting the volatile components, so that the microcapsules stored at 4°C had about half life which was 80 days more than the the samples stored at 25°C.

Key Words: Microencapsulation, Spearmint Oil, Maltodextrin /Arabic Gum, Spray Drying.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 512-525

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۵۲۵-۵۱۲

مدل‌سازی سینتیک انتقال جرم طی فرایند سرخ‌کردن عمیق ناگت مرغ پوشش داده شده با خمیرآبه حاوی صمغ قدومه شهری و ایزوله پروتئین سویا

حامد مهدویان‌مهر[۱]، آرش کوچکی[۲*]، محبت محبی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۲۳

چکیده

هدف این پژوهش، ارزیابی اثر جایگزینی صمغ قدومه شهری (۰/۵ و۱ درصد) و ایزوله پروتئین سویا (۲ و۴ درصد) به‌عنوان بخشی از آرد گندم، بر ویژگی‌های جریانی خمیرآبه، میزان جذب پوشش و پارامترهای سینتیک انتقال جرم ناگت مرغ طی سرخ کردن عمیق، در دماهای ۱۷۰،۱۵۰و ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد و دوره‌های زمانی صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و۵ دقیقه می‌باشد. صمغ قدومه شهری اثر بیشتری بر افزایش ویسکوزیته ظاهری نسبت به ایزوله پروتئین سویا داشت. تمامی نمونه‌ها رفتارغیرنیوتنی، شل‌شونده با برش داشتند ($n\leq$۰/۵۲۱) و به خوبی با مدل قانون توان برازش شدند ($R^2\geq$۰/۹۹۴). جذب پوشش بر سطح ماده غذایی بطور معنی‌داری تحت تاثیر ثابت قوام خمیرآبه قرار داشت. بیشترین مقادیر سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر برای ناگت‌های پوشش‌دار شده با خمیرآبه شاهد، بدست آمد. ضریب نفوذ مؤثر با افزودن ایزوله پروتئین سویا و صمغ قدومه شهری به ترتیب m^2/s ۱۰ $^{-8}$ ×۵/۴۶ –۳/۵۵ با ضریب تبین ۰/۸۵–۰/۹۵و m^2/s ۵/۳۲×۱۰$^{-8}$ – ۳/۳۸ با ضریب تبین ۰/۸۸–۰/۹۳کاهش یافت. دامنه انرژی فعال‌سازی برای حذف رطوبت و جذب روغن نمونه شاهد بین (kJ/mol) ۱۰/۷۹ و (kJ/mol) ۷/۹۱– ، در نمونه‌هایی پوشش‌دار شده حاوی ایزوله پروتئین سویا بین (KJ/mol) ۱۳/۳۷- ۱۷/۶۴و (KJ/mol) ۵/۹۰– تا ۹/۱۸– و در نمونه‌های حاوی صمغ قدومه شهری به ترتیب بین(kJ/mol) ۱۱/۹ -۱۴/۷و (KJ/mol) ۷/۵۶– تا ۱۰/۳۰– به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: انتقال جرم، سرخ کردن عمیق، ایزوله پروتئین سویا، صمغ قدومه شهری، ناگت مرغ.

مقدمه

سرخ‌کردن عمیق فرایند غوطه‌ور سازی ماده غذایی در روغن داغ، با هدف دستیابی به ترکیبی از زمان پخت کوتاه و ایجاد ویژگی‌های منحصر به فرد در محصول می باشد (Saguy and Dana۲۰۰۶,). در طی فرآیند سرخ کردن به علت وقوع پدیده انتقال همزمان جرم و حرارت ، بخشی از آب محصول توسط حرارت تبخیر شده و درنتیجه جایگزینی آن با روغن از طریق پدیده جذب می‌شود (Moreira*etal*, 1999). از سوی دیگر، انتقال سریع حرارت و اختلاف زیاد درجه حرارت ما بین سطح ماده غذایی و روغن از طریق اثرگذاری بر ساختار فیزیکوشیمیایی مواد، منجربه دستیابی به ویژگی‌های خاص بافتی و حسی در محصول می‌گردد (Fiszman,Salvador, 2003؛ Dogan,*et al.*2005؛ Adedeji, *et al.* 2009). محتوای بالای روغن جذب شده در حین سرخ کردن مشکل عمده فراورده‌های سرخ کردنی از دیدگاه تغذیه‌ای و سلامت می‌باشد (Salvador *et al.*2005) و به‌عنوان یک فاکتور مهم و مؤثر بر کیفیت تغذیه ای و حسی محصول در نظر گرفته می‌شود (DehghanNasiri *et al.,* 2011؛ Soorgi *et al.,* 2012). نتایج مطالعات نشان می دهد که میزان روغن جذب شده، خود تحت تاثیر عوامل مختلفی نظیر دمای روغن، زمان سرخ کردن، محتوای رطوبتی و مواد تشکیل دهنده ماده غذایی، سطح محصول، نسبت وزن ماده غذایی به حجم روغن سرخ کردنی، پیش تیمارها، نوع روغن و ترکیب شیمیایی آن، نسبت سطح محصول به حجم آن و فشار محیط می‌باشد(Moreira*et al.*, 1999؛ Salvador*etal.*, 2005؛ Rimac-Brncic*et al.*, 2004).

براین اساس، تاکنون راهکارهای متفاوتی جهت تولید فرآورده‌های غذایی با کیفیت بالا و محتوای روغن کاهش یافته پیشنهاد شده است، که از آن جمله می‌توان به تغییر روش‌سرخ کردن، اصلاح محیط سرخ کردن و ویژگی‌های ماده غذایی، استفاده درست از دما و زمان سرخ‌کردن، پیش سرخ‌کردن، و نیز پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی اشاره کرد (Mellema,2003؛ Ziaiifar *et al.*, 2008).

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجویدکتری، دانشیار و استاد، گروهعلوموصنایعصنایعغذایی، دانشکده کشاورزی،دانشگاهفردوسی.
(* - نویسنده مسئول:Email: koocheki@um.ac.ir)

در بین این روش‌ها، استفاده از پوشش‌های خوراکی با سیستم خمیرآبه[1]، به دلیل افزایش پذیرش کلی محصول از جانب مصرف کننده، بهبود ارزش تغذیه‌ای، کاهش جذب چربی، بهبود رنگ و نیز ایجاد بافتی دلپذیر جایگاه ویژه‌ای در تولید محصولات سرخ کردنی پیدا نموده است (Fiszman & Salvador,۲۰۰۳). بطوری که، ناگت مرغ با بافت و طعمی دلپذیر خود به‌عنوان یکی از پر مصرف‌ترین محصولات سرخ‌کردنی پوشش داده شده در سراسر جهان می‌باشد (Soorgi *et al.*,۲۰۱۲).

خمیرآبه در صنعت مواد سرخ کردنی به‌عنوان مایعی ویسکوز متشکل از آب و آرد با سایر اجزاء جزئی (طعم‌دهنده‌ها، پروتئین‌ها، صمغ‌ها و مواد حجم‌دهنده) شناخته شده، که ماده غذایی قبل از سرخ‌کردن در آن غوطه ور می‌شود (Dehghan Nasiri *et.,* ۲۰۱۱ *al.,*). خصوصیات جریانی خمیرابه نقش مهمی در موفقیّت فرایند پوشش‌دهی داشته و بر ویژگی‌های کیفی و کمی محصول از جمله میزان جذب خمیرآبه[2]، ظاهر، بافت، تخلخل و میزان بازدهی محصول نهایی مؤثر می‌باشد (Sahin &Sumn,۲۰۰۹). به‌طوری که، استفاده از خمیرآبه غیر ویسکوز، منجر به ایجاد پوششی متخلخل شده و جذب بیشتر روغن را موجب می‌گردد. در حالی که، ویسکوزیته بالای خمیرآبه ایجاد لایه‌ای ضخیم بر سطح محصول نموده، و منجر به عدم پخت کافی محصول با تردی نامناسب و پوسته‌ای ناهموار می‌گردد، که در نهایت جذب بیشتر روغن را به همراه دارد (Fiszman & Salvador,۲۰۰۳). بنابراین، بررسی خصوصیات جریانی خمیرآبه، جهت ارزیابی همبستگی میان ویسکوزیته خمیرآبه با میزان جذب پوشش، و نیز ارتباط این خصوصیات با ویژگی‌های کیفی محصول نهایی بسیار مهم می‌باشد. ترکیبات تشکیل‌دهنده، غلظت هر ترکیب و نیز نسبت آب به ماده خشک مهمترین فاکتورهای مؤثر بر خصوصیات جریانی خمیرآبه می‌باشند (Ngadi,Xue &۲۰۰۶؛ Salvador, Fiszman &۲۰۰۳).

پروتئین‌ها و صمغ‌ها به لحاظ ویژگی‌های عملکردی خاص خود، از اهمیت خاصی در میان ترکیبات افزودنی به فرمولاسیون خمیرابه برخوردار می‌باشند. به‌طوری که تاکنون، فرمولاسیون‌های مختلفی از صمغ‌ها و پروتئین‌ها ، به عنوان مثال، اختلاط یا جایگزینی آرد گندم با آرد سویا و آرد ذرت (Dehghan Nasiri *et al.*,۲۰۱۱)، صمغ کربوکسی متیل‌سلولز و HPMC (Chen *et al.*,۲۰۰۸)، صمغ هیدروکسی پروپیل متیل سلولز، گوار، زانتان و صمغ عربی (Sahin *et al.*,۲۰۰۵)، دکسترین و تخم مرغ (Baixauli *et* ۲۰۰۳ *al.,*)، ایزوله پروتئین سویا (Dogan *et al.*,۲۰۰۵)، صمغ متیل سلولز، و پیش تیمارشده با مایکروویو (Soorgi*et al.*,۲۰۱۲)، در جهت پوشش‌دهی وکاهش بیشتر جذب روغن، و اثرگذاری فرمولاسیون بر سینتیک جذب روغن و دفع رطوبت در محصولات غذایی مورد مطالعه قرارگرفته اند.

صمغ دانه قدومه شهری، با نام علمی *Lepidium perfoliatum*، حاوی ۸۸/۲۳ درصد کربوهیدرات و ۴/۶ درصدپروتئین بوده که در محیط آبی به موجب ظرفیت بالای جذب آب و حلالیت کم خود، باعث پایداری سیستم کلوئیدی و افزایش ویسکوزیته محیط می‌شود (Koochekiet *al.*,۲۰۱۳؛Koocheki *et al.*,۲۰۰۹). با توجه به ویژگی گرانروی ساز صمغ به‌نظر می‌رسد، استفاده از آن در فرمول خمیرآبه بتواند منجربه کاهش جذب روغن و افزایش کیفیت ناگت مرغ شود.

ایزوله پروتئین سویا از دسته پروتئین‌های با قدرت آب دوستی بالا بوده که به علت خواص عملکردی آن، به ویژه توانایی تشکیل و تثبیت امولسیون، تمایل به جذب رطوبت و حفظ آب در محصول نهایی، کنترل جذب روغن، توانایی تشکیل فیلم و تاثیرگذاری بر روی بافت، کنترل رنگ (قهوه‌ای شدن و بلانچینگ) و هوادهی تحقیقات گسترده‌ای بر روی آن صورت پذیرفته است (Wolf & ۱۹۷۵ Cowan,). نتایج تحقیقات در خصوص استفاده از ایزوله پروتئین سویا در فرآوردهای سرخ کردنی نشان داده است که این پروتئین نسبت به پروتئین‌های آب پنیر و تخم‌مرغ دارای خواص کاربردی بهتر جهت استفاده در سیستم‌های خمیرآبه می‌باشد (Dogan*et al.*,۲۰۰۵ b).

اگرچه تاکنون، تحقیقات گسترده‌ای بر روی عملکرد صمغ‌های تجاری و پروتئین‌هایی نظیر گلوتن و آب پنیر در بهبود خصوصیات خمیرآبه و کیفیت محصولات سرخ‌کردنی انجام گرفته است. با این حال، اطلاعات کمی در خصوص عملکرد صمغ‌های بومی بر خصوصیات رئولوژیکی خمیرآبه و خصوصیات کیفی ناگت مرغ در دسترس می‌باشد. از این رو هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر جایگزینی نسبت‌های مختلف صمغ قدومه شهری و ایزوله پروتئین سویا بر ویژگی‌های رئولوژیکی خمیرابه، جذب پوشش، دفع رطوبت و جذب روغن، و نیزسینتیک انتقال جرم ناگت‌های مرغ سرخ شده به روش عمیق می‌باشد. نتایج این پژوهش می‌تواند به‌منظور بهینه‌سازی و کنترل فرایند سرخ‌کردن عمیق محصولات سرخ‌کردنی بکاررود.

موادوروش‌ها

آماده سازی نمونه‌ها

مواد اولیه‌ی شامل گوشت سینه مرغ، آرد گندم (رطوبت ۱۳/۶ درصد، پروتئین ۱۰/۶ درصد، چربی۱/۴ درصد) از شرکت آرد فریمان، مواد طعم دهنده، روغن آفتابگردان (شرکت نینا، ایران)، و دانه قدومه شهری از فروشگاه‌های محلی تهیه گردید. آرد سوخاری از شرکت

1 Batter
2 Batter pickup

نوین بریانک مشهد، حلال هگزان از شرکت دکتر مجلّلی[1] و ایزوله پروتئین سویا (۹۲ ٪ پروتئین بر پایه وزن خشک) از شرکتFSL (Food Specialties' LTD, CHINA) خریداری شد

به‌منظور آماده‌سازی خمیرآبه، مواد خشک (آرد گندم ۹۴، ۹۵، ۹۶، ۹۶/۵ درصد، نمک ۱/۵ درصد، مواد حجم‌دهنده ۰/۵درصد و ایزوله پروتئین سویا (۲ و ۴ درصد)، یا صمغ قدومه شهری در غلظت‌های (۰/۵ و ۱درصد) با استفاده از همزن دستی (کاتومو- ژاپن مدل BH-HA۳۲۲۰) در سرعت ۱۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد. در تمام فرمول‌ها پروتئین و صمغ جایگزین آرد شده و نسبت ماده خشک به آب ۳:۵ (وزنی/وزنی) در نظر گرفته شد.

مخلوطی از گوشت سینه مرغ (۸۸ درصد)، پیاز (۱۰ درصد)، فلفل (۰/۵ درصد) و نمک (۱/۵درصد)، به‌عنوان بخش گوشتی ناگت مرغ در ابعاد۲/۰±۱/ ۱×۶/ ۲×۴/۵ (سانتی‌متر)، با استفاده از یک قالب استیل برش داده شد. نمونه‌های آماده شده در خمیرآبه با دماهای ۲۵ºC به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور گردید و به مدت ۳۰ ثانیه جهت طی شدن مرحله چکاندن خمیرآبه اضافی و حذف خطای آزمون به صورت عمودی نگه داشته شد. سپس، نمونه‌ها توسط پودر سوخاری پوشانده شد.

سرخ‌کردن عمیق

سرخ‌کردن نمونه‌ها پوشش داده شده در یک سرخ‌کن برقی سوزکی ژاپن (مدل ۸۸۰ -ZDF) با حجم ۲/۵ لیتر حاوی روغن آفتابگردان نینا، در ۵ دوره زمانی بین صفر تا ۵ دقیقه در سه دمای۱۵۰،۱۷۰و۱۹۰ºC صورت پذیرفت. روغن پیش از شروع فرایند، به مدت یک ساعت در دماهای مذکور نگهداری و در هر بار تعداد ۶ نمونه در سرخ‌کن قرار داده شد. روغن سطحی نمونه‌ها بلافاصله بعد از خروج از سرخ کن توسط دستمال کاغذی حذف و تا دمای محیط سرد شد.

بررسی رفتار جریانی خمیرآبه

رفتار جریان خمیرآبه با استفاده از ویسکومتر چرخشی بوهلین[2] در دمای ۲۵°C بررسی شد. اسپیندل‌های[3]مناسب (C14, C25, C30) با توجه به ویسکوزیته‌ی ظاهری نمونه‌ها انتخاب گردید. درجه‌ی برشی به‌صورت خطی از ۱۴ تا۴۰۰ (s^{-1}) افزایش یافت. رفتار جریانی خمیرآبه بر اساس برازش داده‌ها (درجه برش- تنش برشی) با مدل قانون توان توسط نرم افزار Slidewritte نسخه ۷ مورد بررسی قرار گرفت.

1Dr.Mojallali
2 Bohlin Model Visco 88, Bohlin Instruments, UK
3 Spindles

جذب خمیرآبه[4]

اندازه‌گیری فاکتور جذب پوشش به‌عنوان شاخصی از میزان چسبندگی و ویسکوزیته خمیر با استفاده از رابطه ذیل محاسبه شد (Akdeniz *et al*.,۲۰۰۶).

$$\text{جذب پوشش} = (W_b - W_n) / W_n \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

که W_n، وزن نمونه قبل از پوشش دهی و W_b، وزن نمونه پس از پوشش دهی می‌باشد.

اندازه‌گیری محتوای رطوبت و روغن

اندازه‌گیری محتوای رطوبت نمونه‌های سرخ شده مطابق با استاندارد (۱۹۸۶) AACC، با استفاده از آون(Memmert, ۱۵۴۱۰۰- Beschickung-loading, Model ۸۰۰۰) در دمای ۱۰۵°C به‌مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. محتوای رطوبت بر مبنای وزن خشک محاسبه گردید.

تعیین محتوای روغن با استفاده از استاندارد (۱۹۹۰)AOAC، انجام گرفت. نمونه‌های خشک شده‌ی مورد استفاده برای اندازگیری رطوبت، ابتدا با استفاده از آسیاب (ناسیونال، K039131) آسیاب شده، سپس ۴-۲ گرم از نمونه‌های خشک و آسیاب شده در کارتوش قرار گرفت. استخراج روغن با استفاده از هگزان و با استفاده از سوکسله در طی سیرکولاسیون ۶ ساعت حلال انجام گرفت. بعد از استخراج، کارتوش‌ها به‌مدت یک ساعت جهت حذف حلال و رطوبت در آون ۱۰۵°C قرار گرفتند. محتوای روغن نیز بر مبنای وزن خشک محاسبه گردید.

مدل‌سازی سینتیک انتقال جرم

واکنش‌های فیزیکوشیمیایی محصولات غذایی در حین فرآوری با سرعت و شدت خاصی انجام می‌پذیرد، که بر کیفیت ماده غذایی موثر است (Krokida*et al*.,۲۰۰۱). مدل‌سازی سینتیکی با روش‌های معتبر عددی ابزاری مناسب برای توصیف کمی این تغییرات و شدت آن در حین فرایند می‌باشد، که می‌تواند نقش مهمی در شناخت و ارزیابی شرایط فرایند، جهت تولید محصولی با کیفیت بهتر و هزینه کمتر در اختیار ما قرار دهد (Soorgi *et al*.,۲۰۱۲). افت رطوبت و جذب چربی دو پدیده اصلی انتقال جرم در طی سرخ کردن عمیق هستند (*et al*.,Ngadi۲۰۰۶).

بررسی سینتیک دفع رطوبت در حین فرآیند سرخ‌کردن

محتوای رطوبت ماده غذایی از مهمترین عوامل مؤثر در جذب روغن و کیفیت محصولات سرخ‌شده می‌باشد، که عموماً به صورت

کسری از مقدار رطوبت بر واحد جرم محصول بیان می‌گردد. مهمترین عوامل موثر بر محتوای رطوبت ماده غذایی سرخ شده، دمای روغن و مدت زمان سرخ‌کردن می‌باشد. به‌طوری که، کاهش رطوبت ماده غذایی درحین سرخ کردن به‌صورت نمایی با گذشت زمان تا رسیدن به مقدار تعادلی ادامه می‌یابد (Barrufet,۱۹۹۸Moreira&)، و دمای بالاتر روغن، ضریب انتشار و سرعت از دست رفتن رطوبت را افزایش می‌دهد (Sahin &Sumn,۲۰۰۹). با این حال، بیان پدیده انتقال رطوبت در فرایند سرخ کردن به دلیل شرکت داشتن مکانیسم‌های مختلف و پیچیده توصیفی، نظیر مکانیسم نفوذ مولکولی، حرکت رطوبت درلوله‌های موئین، نفوذ روغن در خلل و فرج ماده جامد،ن فوذ بخار در منافذ حاوی هوا و جریان هیدرودینامیکی بسیار دشوار می‌باشد. از این‌رو، به منظور ایجاد الگوی ساده‌ای از انتقال جرم در طی سرخ‌کردن و داشتن هماهنگی مناسب بین داده‌های تجربی و ارزش‌های محاسبه شده از قانون دوم انتشار فیک استفاده می‌گردد (Adedeji*et al.*, ۲۰۰۹؛ Dehghan Nasiri*et al.*,۲۰۱۱).

$$\frac{\partial m}{\partial t} = D_{eff} V^2 m \qquad (۲)$$

که در این رابطه m محتوای رطوبت (Kg/Kg, db)، t زمان(s) و D_{eff} ضریب نفوذ مؤثر (m^2/s) می‌باشد.

با فرض ناچیز بودن میزان رطوبت تعادلی (m_e) و انتقال رطوبت از هر دو طرف محصول، از حل دیفرانسیل جزئی معادله فوق توسط (Crank,۱۹۷۵)، برای تیغه نامحدود می‌توان استفاده کرد (معادله۳).

$$MR = \frac{m-m_e}{m_o-m_e} = \frac{8}{\pi^2}\sum_{n=0}^{\infty}\frac{1}{(2\pi+1)}\exp\left[-(2n+1)^2\frac{\pi^2 D_{eff}t}{L^2}\right] \qquad (۳)$$

که MR نسبت رطوبت (بدون بعد)، M متوسط میزان رطوبت بر مبنای وزن خشک (Kg/Kg db)، در زمان t (s) و M_o رطوبت اولیه برحسب وزن خشک (kg/Kg db)، m_e میزان رطوبت تعادلی، t زمان سرخ‌کردن (s)، L نصف ضخامت تیغه (m)، D_{eff} ضریب نفوذ مرثر (m^2/s) می‌باشد (Dehghan Nasiri*et al.*,۲۰۱۱؛ Adedeji *et al.*, ۲۰۰۹).

که در آن k، ثابت سرعت انتشار رطوبت بوده و رابطه آن با ضریب نفوذ به صورت زیر می‌باشد؛

$$D_{eff} = \frac{4kL^2}{\pi^2} \qquad (۴)$$

ضریب نفوذ مؤثر رطوبت تحت تاثیر نوع محصول، نوع روغن، دما و تیمارهای پیش از سرخ کردن می‌باشد.

جهت بررسی سنتیک دفع رطوبت، ابتدا نسبت رطوبت MR (Mc/Mo) با استفاده از داده‌های تجربی برای تمام نمونه‌ها محاسبه وسینتیک افت رطوبت از رابطه‌ی (۴) بدست آمد. مقادیر ضریب نفوذ موثر(D_{eff}) با رسم $Ln(M_r)$ در برابر زمان، با توجه به شیب خط یا ثابت سرعت افت رطوبت (k) بر اساس رابطه (۵) با استفاده از نرم افزارMATLAB (۲۰۱۰ b)، به دست آمد.

بررسی سینتیک جذب روغن در فرایند سرخ‌کردن

جهت توصیف سینتیک جذب روغن در ناگت های سرخ شده، از دو مدل پیشنهادی توسط Moyano and Pedreschi (۲۰۰۶) و (Krokida *et al.*,۲۰۰۱)، معادلات ۶ و۷ استفاده شد.

مدل اول، مدل تجربی سرعت جذب روغن Moyano and Pedreschi(۲۰۰۶)

$$O = \frac{O_{eq}kt}{1+kt} \qquad (۵)$$

مدل دوم، مدل سینتیکی مرتبه اول توسط Krokida *et al.*(2001).

$$FC = C_0[1-\exp(-kt) \qquad (۶)$$

که در معادلات FC و O میزان روغن بر پایه وزن خشک، C_0 و O_{eq} میزان روغن تعادلی و kt سرعت انتشار روغن می‌باشد. روغن تعادلی (O_{eq}) به‌عنوان بیشینه روغنی شناخته شده که نمونه طی سرخ‌کردن (در زمان بی نهایت) می‌تواند جذب کند.

ثابت سرعت جذب روغن (K)، به متغیرهای اصلی فرایند مانند نوع و درجه حرارت روغن، نوع و ابعاد محصول، پیش تیمارها و شرایط سرخ کردن وابسته است. ثابت k با افزایش دما و سطح انرژی مایکروویو، آنزیم‌بری و خشک کردن قبل از سرخ‌کردن عمیق افزایش می‌یابد (Adedeji *et al.*۲۰۰۹؛ Soorgi *et al*,.۲۰۱۲). ثابت سرعت جذب روغن (k) و میزان روغن تعادلی (O_{eq}) با استفاده از رابطه‌های (۶ و۷)، با بکارگیری نرم‌افزار MATLAB نسخه ۲۰۱۰b، به دست آمد.

انرژی فعال‌سازی

دما مهمترین عامل خارجی تاثیرگذار برضریب نفوذ مؤثر رطوبت (D_{eff})و ثابت جذب روغن (K) می‌باشد. اثر دما بر این دو شاخص با معادله آرنیوس نشان داده می‌شود (Soorgi*et al.*,۲۰۱۲؛Adedeji *et al.*۲۰۰۹). بررسی اثر درجه حرارت بر سینتیک تغییرات از مدل آرنیوس مطابق رابطه‌ی ۷ محاسبه شد.

$$D_{eff} = D_0 * \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \qquad (۷)$$

که در این معادلات، ضریب نفوذ مؤثر D_{eff} (m^2/s)، E_a انرژی فعال‌سازی (KJ/mol)، Rثابت جهانی گازها (KJ/mol.°k) و T دمای مطلق بر حسب کلوین است. انرژی فعال‌سازی نیز، از طریق رسم منحنی ضریب نفوذ موثر رطوبت و محتوای روغن تعادلی نسبت به 1/T(°K) برای نمونه‌ها با استفاده از نرم افزارExcel نسخه ۲۰۰۷ بدست آمد (Soorgi*et al.*,۲۰۱۲؛Adedeji *et al.*۲۰۰۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمون فاکتوریل و طرح کاملاً تصادفی جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف صمغ (۰/۵ و ۱ درصد) و پروتئین (۲ و۴ درصد)، دمای سرخ کردن (۱۵۰،۱۷۰، ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های سرخ‌کردن (۵ و ۴، ۳، ۲، ۱) بر ویژگی‌های کیفی ناگت‌های سرخ‌شده مورد استفاده قرار گرفت. با مشاهده‌ی معنی‌دار بودن اثر تیمارها در سطح ۹۵ درصد، مقایسه‌ی میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار آماریSPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. کلیه‌ی آزمون‌ها حداقل با ۳ تکرار انجام شد.

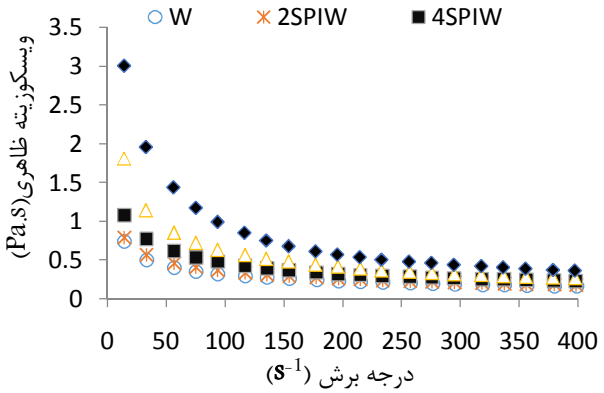
نتایج و بحث

ویژگی‌های رئولوژیکی خمیرآبه

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ویسکوزیته‌ی ظاهری فرمول‌های مختلف خمیرابه با افزایش درجه برش کاهش یافت. این رفتار بیانگر رفتار غیرنیوتونی می‌باشد، که می‌توان آن را به مرتب شدن ماکرومولکولهای خمیرآبه در راستای تنش برشی و درنتیجه کاهش مقاومت ساختار یا اصطلاک بین مولکولی مرتبط دانست(Koocheki *et al.*,۲۰۱۲). آب آزاد نقش مهمی در ویسکوزیته‌ی ظاهری دارد و ویسکوزیته‌ی ظاهری بالاتر، نشان دهنده میزان آب آزاد کمتر است (Soorgi *et al.*,۲۰۱۲؛ Xue & Ngadi,۲۰۰۶). جایگزینی صمغ قدومه شهری (LPSG)[1] و افزایش سطح آن، منجر به افزایش چشم‌گیر ویسکوزیته ظاهری شد (شکل۱). این افزایش ویسکوزیته را می‌توان به به ساختار پلی‌ساکاریدی صمغ قدومه شهری مرتبط دانست. تعداد زیادگروه‌های هیدروکسیل و اثر هیدرودینامیکی متقابل بین گروه‌های قطبی و آبگریز در ساختار بیوپلیمری صمغ، موجب به دام انداختن بخش اعظمی از آب آزاد خمیرآبه و درنتیجه باعث افزایش ویسکوزیته آن می‌گردد (Koocheki *et al.*,۲۰۰۹).

جایگزینی ایزوله پروتئین سویا(SPI)[2] و افزایش سطح آن نیز منجربه افزایش ویسکوزیته‌ی ظاهری نسبت به خمیرابه شاهد شد (شکل۱). افزایش ویسکوزیته‌ی ظاهری نمونه‌های حاوی ایزوله پروتئین سویا را می‌توان به بالا بودن میزان جذب آب و حلالیت بیشتر پروتئین‌های سویا نسبت داد (Singh*et al.*,۱۹۹۶؛ Dogan *et al.*,۲۰۰۵b).

مقادیر ضریب قوام و شاخص رفتار جریان خمیرآبه بر اساس مدل قانون توان در جدول۱ نشان داده شده است. جایگزینی صمغ باعث افزایش ضریب قوام خمیرآبه به دلیل ظرفیت بالای صمغ در نگهداری آب شد(Koocheki *et al.*,۲۰۰۹). نتایج مشابهی در خصوص افزایش ضریب قوام در اثر افزودن صمغ‌های گوار و زانتان (Hsia *et al.*,۱۹۹۲) و متیل سلولز (Sanz *et al.*,۲۰۰۸) گزارش شده است. از نظر آماری جایگزینی ۲ درصد ایزوله پروتئین سویا ، اثر معنی داری بر ضریب قوام آن نداشت (جدول ۱) با این حال، جایگزینی ایزوله پروتئین سویا در سطح ۴ درصد باعث افزایش ضریب قوام سیستم خمیرآبه، به دلیل توانایی بالای پروتئینهای سویادر جذب آب شد($p<۰/۰۵$) (Dogan *et al.*,۲۰۰۵b).



شکل ۱–تغییرات ویسکوزیته‌ی ظاهری فرمول‌های مختلف خمیرآبه در درجه برش‌های s^{-1} ۴۰۰ -۱۴

جدول ۱– اثر فرمول‌های مختلف خمیرآبه بر پارامترهای قانون توان و جذب پوشش (0.5LPSGW)

فرمول خمیرآبه	*n*	*k* (Pa.s)	ضریب تبیین	جذب پوشش(٪)
W	۰/۵۲۱±۰/۰۱۳^{c}	۲/۹۵۹±۰/۰۱۲^{a}	۰/۹۹۵	۱۸/۸۲±۲/۱۵^{a}
۲SPIW	۰/۵۱۰±۰/۰۰۶^{c}	۳/۳۴۲±۰/۰۰۶^{a}	۰/۹۹۴	۱۹/۸۹±۲/۴۷^{a}
۴SPIW	۰/۵۱۱±۰/۰۰۷^{c}	۴/۴۲۷±۰/۰۰۷^{b}	۰/۹۹۶	۲۱/۶۹±۰/۷۳^{a}
۰/۵LPSGW	۰/۴۰۵±۰/۰۰۴^{b}	۹/۴۷۳±۰/۰۰۴^{c}	۰/۹۹۶	۳۴/۶۸±۱/۶۸^{b}
۱LPSGW	۰/۳۱۶±۰/۰۰۲^{a}	۲۱/۴۹۶±۰/۰۰۲^{d}	۰/۹۹۷	۴۲/۳۳±۱/۲۷^{c}

شاخص رفتار جریان برای تمامی فرمول‌های خمیرآبه کم‌تر از یک بود. این امر نشان‌دهنده‌ی رفتار غیرنیوتنی رقیق‌شونده با برش در خمیرآبه است (Koocheki *et al.*,۲۰۰۹). جایگزینی صمغ قدومه شهری منجربه کاهش معنی دار شاخص رفتار جریان (*n*)، یا به عبارت دیگر گسترش رفتار رقیق‌شوندگی با برش خمیرآبه شد ($p<۰/۰۵$). صمغ قدومه شهری در محلول‌های آبی دارای خاصیت شبه پلاستیک بوده است (Koocheki *et al.*,۲۰۱۳). افزایش خاصیت شبه پلاستیک صمغ قدومه شهری در سیستم خمیرآبه را می‌توان به جهت‌گیری ماکرومولکول‌های صمغ قدومه شهری در جهت برش و

1 *Lepidium perfoliatum* seed gum
2 Soya proteins isolate

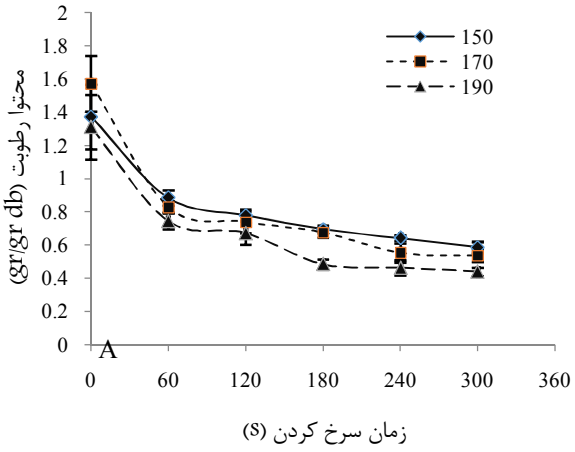
توانایی آن در همراه نمودن سایر ترکیبات خمیرآبه با خود مرتبط دانست. نتایج مشابهی در خصوص عملکرد صمغ هیدروکسی پروپیل متیل سلولز در خمیرآبه آرد برنج (Amboon *et al.*,۲۰۱۰) و صمغ زانتان در مخلوط نشاسته ذرت (Kim & Yoo,۲۰۰۶)گزارش شده است. افزودن ایزوله پروتئین سویا به فرمول خمیرآبه اثر معنی‌داری بر شاخص رفتار جریان نمونه‌ها نشان نداد ($p<۰/۰۵$).

جذب پوشش (خمیرآبه)

فرمول خمیرابه تاثیر معنی‌داری بر شاخص جذب پوشش داشت ($p<۰/۰۵$). همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین میزان جذب خمیرآبه مرتبط به نمونه‌های پوشش‌دار شده با فرمول حاوی غلظت بالای صمغ می‌باشد. ضریب قوام بالای این فرمول، احتمالا در مرحله چکانیدن، مقاومت به جریان بالاتری را ایجاد می‌نماید که در نتیجه لایه‌ی ضخیم‌تری از پوشش بر سطح محصول باقی می‌ماند. چن و همکاران (۲۰۰۸) و دگان و همکاران (۲۰۰۵a)، نیز رابطه‌ی مستقیم بین ویسکوزیته‌ی ظاهری و میزان جذب خمیرابه گزارش نموده اند.

محتوی رطوبت و روغن ناگت‌های مرغ سرخ شده

دفع رطوبت و جذب روغن دو فرایند اصلی انتقال جرم طی سرخ‌کردن عمیق مواد غذایی محسوب می‌شوند. سرعت این فرایندها بطور مستقیم تابع دما و زمان سرخ‌کردن می‌باشد (Nagdi *et al.*,۲۰۰۷). همانطور که انتظار می‌رفت، افزایش زمان سرخ‌کردن باعث کاهش محتوای رطوبت ناگت‌های مرغ گردید. روند کاهشی محتوای رطوبت تمامی نمونه‌ها در دقیقه اول فرایند سریع‌تر بود که این امر ناشی از حذف رطوبت از سطح نمونه‌ها می‌باشد (شکل۲). روند دفع رطوبت مشابهی توسط Nagdi *et al.*(۲۰۰۷)، Soorgi*et al.*(۲۰۱۲) و Adedeji *et al.*(۲۰۰۹)، طی فرایند سرخ‌کردن عمیق گزارش شده است. افزایش دما باعث افزایش افت رطوبت در نمونه‌ها گردید (شکل۲). این نتایج با گزارش Krokida *et al.* (۲۰۰۱) در خصوص خلال‌های سیب‌زمینی سرخ‌شده، مطابقت داشت. همان‌طور که جدول ۲، مشاهده می‌شود، بالاترین میزان افت رطوبت مربوط به نمونه‌های پوشش‌دار شده با فرمول شاهد می‌باشد. خمیرآبه شاهد پائین‌ترین میزان ویسکوزیته‌ی ظاهری و جذب پوشش را نیز در مقایسه با سایر فرمول‌های‌خمیرآبه دارا بوده است (جدول۱). این امر را می توان به پائین بودن ظرفیت اتصال آب در خمیرابه مرتبط دانست، بطوری که، افزایش میزان آب آزاد در خمیرآبه منجر به کاهش جذب پوشش و تسهیل فرایند تبخیر طی سرخ‌کردن می‌گردد (Akdeniz *et al.*,۲۰۰۶).



شکل ۲–اثردما و زمان سرخ کردن بر محتوی رطوبت ناگت‌های مرغ پوشش داده شده با خمیرآبه حاوی ۲ درصد ایزوله پروتئین سویا

جایگزینی صمغ قدومه شهری به فرمول خمیرآبه موجب افزایش معنی دار محتوای رطوبت ناگت‌های مرغ سرخ شده گردید ($p<۰/۰۵$). افزایش درصد جایگزینی صمغ به ۰/۵ و ۱ درصد نیز، به ترتیب موجب افزایش ۳۱ و ۳۵ درصدی در محتوای رطوبت نمونه ها در دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد طی پنج دقیقه فرایند سرخ‌کردن شد (جدول۲). این امر ممکن است ناشی از ظرفیت بالای اتصال با آب صمغ قدمه شهری و مقاومت آن در برابر خروج رطوبت محصول باشد. نتایج بدست آمده با گزارش آک دینز و همکاران (۲۰۰۶) و کیم و یااو (۲۰۰۶) در خصوص افزایش محتوای رطوبت در نمونه‌های پوشش داده شده با خمیرآبه حاوی صمغ‌های زانتان، گوار، هیدروکسی پروپیل متیل سلولز، و ترکیبی از صمغ گوار و زانتان در فرایند سرخ‌کردن به روش عمیق مطابقت داشت.

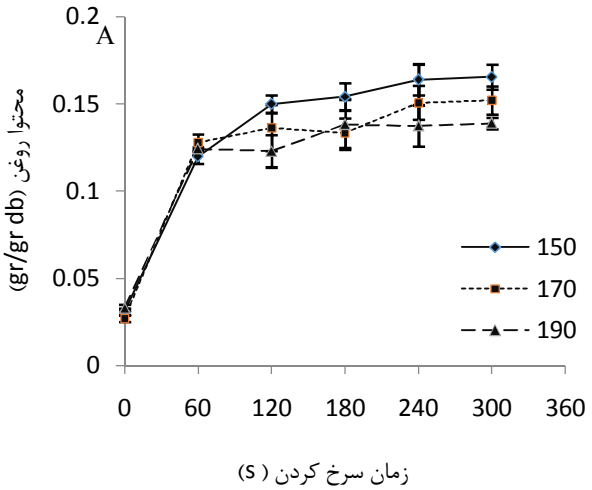
جایگزینی ۲ و ۴ درصدی ایزوله پروتئین سویا باعث افزایش ۷ تا ۱۲ درصدی محتوای رطوبت در دقیقه پنجم فرایند سرخ‌کردن در دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به نمونه شاهد شد (جدول۲). این افزایش نسبی محتوی رطوبت را می‌توان ناشی از ظرفیت بالای پروتئین‌های سویا برای اتصال با آب و قابلیت تشکیل فیلم این پروتئین‌ها در طی فرایند حرارتی دانست. نتایج مشابهی توسط دهقان نصیری و همکاران (۲۰۱۱) و دگان و همکاران (۲۰۰۵a) در خصوص افزایش محتوای رطوبت ناگت‌های پوشش داده شده با خمیرآبه حاوی آرد سویا و ایزوله پروتئین سویا گزارش گردیده است.

شکل ۳ روند تغییرات محتوای روغن محصول را با گذشت زمان در دماهای مختلف را نشان می‌دهد. در تمامی نمونه‌ها، دردقایق ابتدایی فرآیند، جذب روغن به شدت افزایش یافت و پس از آن ثابت باقی ماند. روند مشابهی توسط Troncoso& (۲۰۰۹) Pedreschi،(۲۰۰۷)Duran*et al.*و (۲۰۰۹) Adedeji *et al.* گزارش

شده است.

جذب سریع روغن در لحظات ابتدایی سرخ کردن را می‌توان به حذف رطوبت سطحی نمونه‌ها نسبت داد. بطوری که در ابتدای فرایند سرخ کردن، دفع سریع رطوبت از سطح و افزایش تخلخل در پوسته، موجب سهولت بیشتر درجذب روغن می‌شود. با گذشت زمان سرخ کردن، با رسیدن به سطح روغن تعادلی (O_{eq})، بخش اعظمی از تخلخل ایجاد شده در پوسته از روغن اشباع شده و سرعت جذب روغن کاهش می‌یابد (Moreira *et al.*,۱۹۹۹).

افزایش درجه حرارت سرخ کردن در تمامی نمونه‌ها باعث کاهش جذب روغن در محصول نهایی شد (شکل۳). کاهش جذب روغن در دمای بالاتر، با وجود شدت فعل و انفعالات بیشتر را می‌توان به تغییرات بافتی و تشکیل سریع‌تر پوسته در سطح محصول که به‌عنوان مانعی فیزیکی بین ماده‌ی غذایی و روغن اطراف عمل می‌کند مرتبط دانست Ngadi *et al.*,(۲۰۰۹)، Dana,Saguy(۲۰۰۶) and Dehghan Nasiri (۲۰۱۱)، Troncoso, and Pedreschi,(۲۰۰۹)، *et al.* و(۲۰۱۲) Soorgi *et al*, به نتایج مشابهی به ترتیب در خلال سیب زمینی، ناگت میگو و مرغ دست یافتند.



شکل ۳-اثردما و زمان سرخ‌کردن بر محتوی روغن ناگت‌های مرغ پوشش داده شده با ۰/۵درصد صمغ قدومه شهری

جذب روغن و دفع رطوبت در نمونه‌های پوشش‌دار شده با خمیرآبه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر نمونه‌ها بود (جدول ۳ و۲). به‌طورکلی جذب روغن بیشتر، در نمونه‌های با محتوای رطوبت پایین‌تر (نمونه‌هایی که طی سرخ‌کردن رطوبت بیشتری را از دست داده‌اند) مشاهده شد. این نتایج رابطه‌ی بین میزان حذف رطوبت و جذب روغن را تایید می‌کند. نتایج مشابهی توسط بسیاری از محققان گزارش شده است (Salvador et al.,۲۰۰۵ ؛ Mellema,۲۰۰۳).

استفاده از صمغ قدومه شهری در فرمول خمیرآبه به دلیل توانایی بالا در ایجاد پیوند هیدروژنی قوی با مولکول‌های آب و سایر ریز ساختارهای خمیرآبه، باعث کاهش جذب روغن و بهبود حفظ رطوبت در نمونه‌ها گردید. نتایج تحقیق Moreira *et al.*(۱۹۹۹) و Soorgi *et al.* (۲۰۱۲) نشان می‌دهد که تشکیل ژل حرارتی و اتصالات عرضی در صمغ‌ها در طی فرایند سرخ‌کردن باعث تشکیل تعداد کمتری منافذ بزرگ با فشار مویینگی کم در اطراف محصول پوشش داده می‌شود، که این امر موجب ورود مقادیرکم روغن به منافذ می‌گردد. Akdeniz *et al.*(۲۰۰۶)، همچنین بیان داشتند که ظرفیت اتصال با آب بالا و اثر صمغ‌ها بر افزایش ویسکوزیته خمیرابه در کنترل جذب روغن موثر است.

با این حال، افزایش غلظت صمغ از ۰/۵ به ۱ درصد با افزایش محتوای روغن همراه بود (جدول ۳). اگرچه این روند معنی‌دار نیست، با این حال به‌نظر می‌رسد که بالا بودن رطوبت سطحی در نمونه‌های پوشش داده شده با خمیرآبه حاوی ۱ درصد صمغ، منجر به تاخیر در زمان تشکیل پوسته و ایجاد نفوذپذیری و تخلخل بیشتر در آن می‌شود. به‌طوری که Moreira *et al.*(۱۹۹۹) نیز در این خصوص بیان داشتند که تشکیل دیرتر پوسته در دماهای پائین‌تر، می‌تواند موجب ایجاد پوسته‌ای متخلخل با نفوذپذیری بالاتر گردد.

افزودن ایزوله پروتئین سویا و افزایش درصد جایگزینی آن باعث کاهش محتوای روغن شد (جدول۳)، این امر می‌تواند ناشی از قابلیت تشکیل فیلم پروتئین‌های سویا، ظرفیت اتصال با آب بالاتر آن و در نتیجه ویسکوزیته‌ی بالاتر و دفع پائین تر رطوبت در نمونه‌های پوشش داده شده باشد. Dehghan Nasiri *et al.*(۲۰۱۱)؛ Dogan(۲۰۰۵b) *et al.*، نیز کاهشی را در جذب روغن نمونه‌های حاوی پروتئین سویا گزارش کرده‌اند.

سینتیک دفع رطوبت طی فرایند سرخ‌کردن

پارامترهای مختلف مدل دفع رطوبت ناگت‌های مرغ در جدول ۲ نشان داده شده است. فرمول سیستم خمیرابه اثر معنی‌داری بر سرعت دفع رطوبت(k) و ضریب نفوذ مؤثر (D_{eff}) داشت ($p<۰/۰۵$). افزایش دما همچنین منجر به افزایش سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ موثر آن با شدت یافتن فعل و انفعالات شیمیایی گردید. نتایج مشابهی توسط محققان در خصوص اثر فرمول و دما بر سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ موثر گزارش شده است (Dehghan Nasiri *et* ۲۰۱۱ *al.*,؛ Ngadi *et al.*,۲۰۰۹؛ Soorgi *et al.*,۲۰۱۲).

بیشترین مقادیر سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر در دماهای مورد آزمایش برای ناگت‌های پوشش‌دار شده با خمیرآبه شاهد به ترتیب در دامنه $۴/۲۲\times۱۰^{-۳}$(S) – ۳/۲۴ و $۶/۱۶\times۱۰^{-۸}$(m^2/s) – ۴/۷۳۴، با ضریب تبیین ۰/۹۰–۰/۸۲ بدست آمد.

نتایج بدست آمده کمتر از مقادیر گزارشی توسط Soorgi *et al.* (۲۰۱۱) برای ناگت‌های مرغ پوشش داده شده با

آردگندم در محدوده دمایی و روغن یکسان بود. اختلاف ایجاد شده را می‌توان به نوع آرد و حجم روغن مورد استفاده نسبت داد. همچنین ضخامت نمونه‌ها و پوسته ایجاد شده نیز فاکتور کلیدی در تعیین سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر می‌باشد (Fernando *et al.*,۲۰۱۱).

استفاده از صمغ قدومه شهری در فرمول خمیرآبه اثر معنی‌داری بر سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر داشت (جدول۴-۲). جایگزینی ۵/ ۰درصد صمغ قدومه شهری باعث کاهش سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ گردید. این امر می‌تواند ناشی از ظرفیت اتصال با آب بالای صمغ باشد که منجر به کاهش میزان آب آزاد در سیستم می‌گردد. تشکیل ژل حرارتی، به‌عنوان یک مانع در مقابل خروج رطوبت عمل می‌کند و از تبخیر در هنگام فرایند سرخ‌کردن جلوگیری می‌نماید (Soorgi *et al*,.۲۰۱۲). افزایش درصد جایگزنی صمغ قدومه شهری اثر نامطلوبی بر سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر در ناگت‌های مرغ داشت (جدول۲). افزایش سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر آن در نمونه‌های پوشش داده شده با خمیرآبه حاوی غلظت ۱ درصد صمغ قدومه شهری می‌تواند به علت عدم تشکیل ژل حرارتی مناسب در غلظت های بالای صمغ بوده که موجب تضیف خصوصیات ممانعت‌کنندگی پوسته در برابر خروج رطوبت می‌گردد. نتایج مشابهی توسط زمانی و همکاران (۱۳۹۲) در خصوص اثر افزایش غلظت صمغ زانتان بر افزایش سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر در خلال‌های سیب زمینی پوشش داده شده گزارش شده است.

افزودن ایزوله پروتئین سویا به فرمول پوشش باعث کاهش سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر در نمونه‌ها شد. مقادیر سرعت دفع رطوبت و ضریب نفوذ مؤثر به ترتیب (s) $۲/۴۳-۳/۷۴\times۱۰^{-۳}$ و (m^2/s) $۳/۵۵-۵/۴۶\times۱۰^{-۸}$ با ضریب تبیین ۰/۸۵ ۰/۹۵ درصد بدست آمد. نتایج بدست آمده در خصوص عملکرد ایزوله پروتئین سویا با گزارشات Dehghan Nasiri و همکاران (۲۰۱۱) برای آرد سویا و انصاری‌فر و همکاران (۱۳۹۱) در طی بررسی اثر پروتئین‌های سفیده تخم مرغ مطابقت دارد. توانایی بالای پروتئین‌های سویا در ایجاد شبکه فیلم مانند سه‌بعدی از طریق ایجاد پیوندهایکوالانسی قوی باعث ایجاد یک سد قوی درمقابل خروج رطوبت و تبخیر در حین فرایند سرخ‌کردن می‌شود.

سینتیک جذب روغن طی فرایند سرخ‌کردن

ثابت سرعت جذب روغن و میزان روغن تعادلی با استفاده از برازش داده‌های تجربی با مدل‌های ۶ و ۷ انجام شد. اگرچه هر دو معادله توانایی برازش مناسبی با ضریب تبیین بالا داشتند (جدول۳)، اما مقادیر به‌دست آمده برای محتوای روغن در تمامی نمونه‌های بیشتر از مقدار روغن تعادلی (O_{eq})، حاصل از برازش داده‌ها با معادله ۷ بود (جدول۳). به‌عبارت دیگر، اگرچه در هر دو معادله میزان روغن در زمان صفر بسیار ناچیز بوده است، با این حال، داده‌های تجربی با منحنی معادله ۷ تنها در بازه‌های زمان کوتاه سرخ‌کردن به درستی برازش شده و در زمان‌های طولانی‌تر، مدل‌سازی روندی مستقل از زمان را در مدل نشان می‌دهد. نتایج مشابهی توسط (۲۰۰۶) Moyano and Pedreschi و (۲۰۰۹) Troncoso and Pedreschi در ناتوانی معادله ۷، جهت برازش دادهای تجربی فرایند سرخ‌کردن عمیق گزارش شده است.

همان‌طور که درجدول ۳ مشاهده می‌شود، سرعت جذب روغن و میزان روغن تعادلی (O_{eq}) به‌عنوان فاکتورهای مهم در مدل‌سازی فرایند سرخ‌کردن با افزایش دما به ترتیب افزایش وکاهش نشان داند. کاهشO_{eq}، تاییدکننده کاهش میزان جذب روغن با افزایش دما می‌باشد. (۲۰۰۶) Moyano and Pedreschi و (۲۰۰۷) Duran *et al.* نیز به نتیجه مشابهی درخصوص اثر افزایش دما بر مقادیر روغن تعادلی دست یافتند.

سرعت جذب روغن (k_o) نمونه‌های شاهد(w)، نسبت به سایر نمونه‌ها بیشتر بود. افزودن صمغ قدومه شهری به فرمول خمیرآبه موجب کاهش ضریب جذب روغن در نمونه‌های پوشش داده شده نسبت به نمونه شاهدگردید. این امر با توجه به میزان حذف رطوبت کمتر در این نمونه‌ها در طی سرخ‌کردن و خصوصیت ممانعت‌کنندگی صمغ از طریق ایجاد پیوندهای عرضی با سایر ترکیبات فرمول خمیرآبه قابل توجیه است (Dehghan Nasiri *et al.*,۲۰۱۱). با این حال، افزایش غلظت صمغ به ۱ درصد باعث افزایش ضریب جذب روغن شد. این امر، همانطورکه پیش از این بیان شد می‌تواند به علت نقصدر ایجاد ژل حرارتی و تشکیل دیر تر پوسته در غلظت‌های بالای صمغ باشد. زمانی و همکاران (۱۳۹۲)، نتایج مشابهی را در غلظت ۱درصد صمغ زانتان نسبت به غلظت ۰/۵ درصد آن برای پوشش‌دهی خلال‌های سیب زمینی گزارش کردند

افزودن ایزوله پروتئین سویا به فرمول خمیرآبه موجب کاهش سرعت جذب روغن با توجه به توانایی پروتئین‌های سویا در ایجاد لایه فیلم مقاوم به انتقال جرم در طی دناتوراسیون حرارتی و درنتیجه کاهش دفع رطوبت و جذب روغن گردید (Dogan۲۰۰۵,*et al.*؛ Dehghan Nasiri*et al.*,۲۰۱۱؛ انصاری فر و همکاران،۱۳۹۰).

انرژی فعال‌سازی

وابستگی به دما برای ضرایب نفوذ رطوبت و روغن با استفاده از برازش داده‌ها با معادله ۸، بدست آمد. انرژی فعال‌سازی برای حذف رطوبت و جذب روغن نمونه شاهد (w) به ترتیب بین (kJ/mol) ۱۰/۷۹ و (kJ/mol)۷/۹۱- و در نمونه‌هایی حاوی ایزوله پروتئین سویا

بـین (KJ/mol) ۱۳/۳۷ – ۱۷/۶۴و (KJ/mol) ۵/۹۰– تـا ۹/۱۸– ، در نمونه‌های حاوی صمغ قدومـه شـهری بـین(kJ/mol) ۷/ ۱۴–۱۱/۹و (KJ/mol)۷/۵۶– تـا ۱۰/۳۰– بدسـت آمـد. مقـادیر منفـی انـرژی فعال‌سازی جذب روغن،روند نزولی نفوذ روغن را با افزایش دما نشـان می‌دهـد (Adedeji *et al.*,۲۰۰۹).افـزایش دمـا منجـر بـه تشـکیل پوسته‌ای متراکم‌تر در سطح محصول شده کـه باعـث کـاهش جـذب روغن می‌گردد. همچنین، (۲۰۱۲) Soorgi *et al.* نشان دادند که بالا بودن میزان انرژی جهـت ایجـاد ژل حرارتـی متیـل سـلولز، موجـب افزایش انرژی فعال‌سازی می‌شود.

جدول ۲- محتوی رطوبت و پارامترهای سینتیکی k و D_{eff} در ناگت‌های مرغ سرخ‌شده در دماهای ۱۵۰تا۱۹۰درجه سانتی‌گراد

فرمول خمیرابه W	$K\times10^{-3}$ (S)	$D_{eff}\times10^{-8}$ (m^2/s)	R^2	محتوی رطوبت $\times10^{-2}$ (Kg/Kg db)
۱۵۰	۳/۲۴۲±۰/۰۸۲ Da	۴/۷۳۴±۰/۱۲۰ Da	۰/۸۲	۰/۵۶۳±۰/۰۲۲ Ab
۱۷۰	۳/۹۹۸±۰/۴۹۸ Bab	۵/۸۳۹±۰/۷۲۸ Bab	۰/۸۴	۰/۴۸۱±۰/۰۳۸ Aba
۱۹۰	۴/۲۲۰±۰/۱۱۳ Bb	۶/۱۶۳±۰/۱۶۵ Bb	۰/۹۰	۰/۴۰۹±۰/۳۴۰ Aa
2SPIW				
۱۵۰	۲/۵۴۲±۰/۰۹۷ ABa	۳/۷۱۲±۰/۱۴۲ ABa	۰/۸۵	۰/۵۸۷±۰/۰۳۳ Ab
۱۷۰	۳/۴۴۹±۰/۲۹۹ Ab	۵/۰۳۷±۰/۴۳۷ Ab	۰/۸۴	۰/۴۸۷±۰/۰۳۴ Aba
۱۹۰	۳/۷۴۲±۰/۱۸۷ Ab	۵/۴۶۶±۰/۲۷۳ ABb	۰/۹۵	۰/۴۳۹±۰/۰۲۴ Aa
4SPIW				
۱۵۰	۲/۴۳۴±۰/۱۴۰ ABa	۳/۵۵۴±۰/۲۰۵ ABa	۰/۹۵	۰/۷۰۹±۰/۰۳۴ ABb
۱۷۰	۲/۸۶۵±۰/۰۶۰ ABab	۴/۱۸۳±۰/۰۸۷ ABab	۰/۹۲	۰/۵۳۸ ±۰/۰۲۹ ABa
۱۹۰	۳/۵۴۸±۰/۳۹۲ ABb	۵/۱۸۲±۰/۵۷۳ Ab	۰/۹۱	۰/۴۶۶±۰/۰۲۸ ABa
0.5LPSGW				
۱۵۰	۲/۳۱۶±۰/۱۶۰ Aa	۳/۳۸۱±۰/۲۳۴ Aa	۰/۹۰	۰/۷۰۳±۰/۰۴۰ Bb
۱۷۰	۲/۷۱۰±۰/۰۸۸ Aa	۳/۹۵۷±۰/۱۲۹ Aa	۰/۹۳	۰/۶۴۶±۰/۰۴۳ BCab
۱۹۰	۳/۲۷۴±۰/۲۲۱ Ab	۴/۷۸۲±۰/۳۲۳ Ab	۰/۸۸	۰/۵۴۹±۰/۰۳۹ BCa
1LPSGW				
۱۵۰	۲/۷۷۴±۰/۱۷۱ Ca	۴/۰۵۰±۰/۲۵۱ Ca	۰/۹۳	۰/۸۰۰±۰/۰۵۰ Cb
۱۷۰	۲/۹۸۲±۰/۱۹۵ Aa	۴/۳۵۵±۰/۲۸۵ Aa	۰/۹۲	۰/۷۳۵±۰/۰۷۹ Cab
۱۹۰	۳/۵۳۲±۰/۱۴۴ ABb	۵/۳۲۹±۰/۰۳۰ ABb	۰/۹۱	۰/۶۲۴±۰/۰۴۴ Ca

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثـر دمـای روغـن، زمـان سـرخ‌کـردن و فرمـول خمیرابه بر خصوصیات رئولوژیکی آن و پارامترهای سـینتیکی انتقـال جرم طی سرخ‌کردن عمیق ناگت مرغ مورد بررسی قرار گرفت. نتـایج نشـان داد کـه فرمـول خمیرابـه اثـر قابـل تـوجهی بـر خصوصـیات رئولوژیکی، جذب پوشـش و همچنـین دفـع رطوبـت و جـذب روغـن ناگت‌های مرغ سرخ شده‌داشت. نمونه‌های پوشش‌دار شده با خمیرابـه حاوی صمغ قدومه شهری و ایزوله پروتئین سویا منجر به کاهش دفع رطوبت و جذب روغن شدند. با توجه به نتـایج بدسـت‌آمـده، دمـا اثـر مثبتی بر روی ضریب نفوذ موثردارد، به‌طوری که با افـزایش دمـا، بـه دلیل شدت یافتن واکنش‌های فیزیکوشیمیایی ایـن ضـریب افـزایش می‌یابد. همچنین کاهش مقدار روغن تعادلی(Oeq) تأییدکننده کاهش میزان جذب روغن با افزایش دما مـی‌باشـد. میـزان ضـریب نفـوذ در نمونه‌های پوشش‌دار شده با خمیرابه حـاوی ایزولـه پـروتئین سـویا و صمغ قدومه شهری کمتر از نمونه شاهد بود، که این امـر در نتیجـه‌ی توانایی این دسته از ترکیبات در ایجاد سدی در مقابل خروج رطوبت و جذب روغن می‌باشد. بر اساس نتایج پارامترهای سرعت دفع رطوبـت، سرعت جذب روغن و محتوای نهایی روغن در نمونـه‌هـا، جـایگزینی ۰/۵ درصد صـمغ قدومـه شـهری و ۴ درصـد ایزولـه پـروتئین سـویا بـه‌عنـوان بهتـرین فرمولاسـیون جهـت کـاهش جـذب چربـی در محصولات سوخاری شده پیشنهاد می‌گردد.

جدول۳- پارامترهای سینتیکی سرعت جذب روغن(K) و روغن تعادلی(Oqe)ناگت های مرغ در دماهای ۱۵۰تا ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از معادلات۶ و۷.(انحراف معیار ±میانگین).

فرمول خمیرآبه	$K(s^{-1})$	R^2	$K(s^{-1})$	Oqe $\times 10^{-2}$ (Kg/Kg db)	R^2	Oqe $\times 10^{-2}$ (Kg/Kg db)	محتوای روغن $\times 10^{-2}$(Kg/Kg db)
W							
۱۵۰	۰/۰۵۳±۰/۰۰۷^{Ba}	۰/۹۲	۰/۰۲۰۹±۰/۰۰۰^{Ba}	۰/۲۰۰±۰/۰۰۷^{Aa}	۰/۹۰	۱۵۰	۰/۱۹۱±۰/۰۰۳^{Ba}
۱۷۰	۰/۰۸۴±۰/۰۰۶^{Ba}	۰/۹۰	۰/۰۳۸±۰/۰۰۴^{Ba}	۰/۱۸۲±۰/۰۰۰^{Bb}	۰/۸۹	۱۷۰	۰/۱۷۹±۰/۰۰۶^{Cb}
۱۹۰	۰/۱۲۰±۰/۰۳۷^{Aa}	۰/۸۸	۰/۰۴۷±۰/۰۰۷^{Aa}	۰/۱۶۷±۰/۰۰۳^{Dc}	۰/۸۷	۱۹۰	۰/۱۶۳±۰/۰۰۴^{Cb}
2SPIW							
۱۵۰	۰/۰۳۸±۰/۰۰۵^{Aa}	۰/۹۳	۰/۰۲۴±۰/۰۰۱^{Aa}	۰/۱۹۹±۰/۰۰۶^{Aa}	۰/۹۴	۱۵۰	۰/۱۸۷±۰/۰۰۶^{Ba}
۱۷۰	۰/۰۷۲±۰/۰۱۶^{ABb}	۰/۹۴	۰/۰۳۳±۰/۰۰۲^{ABab}	۰/۱۸۱±۰/۰۰۲^{Bb}	۰/۹۳	۱۷۰	۰/۱۷۴±۰/۰۰۴^{BCab}
۱۹۰	۰/۰۹۸±۰/۰۰۷^{Ab}	۰/۹۰	۰/۰۳۹±۰/۰۰۵^{Ab}	۰/۱۵۹±۰/۰۰۲^{Cc}	۰/۹۰	۱۹۰	۰/۱۵۵±۰/۰۰۸^{BCb}
4SPIW							
۱۵۰	۰/۰۳۱±۰/۰۰۵^{Aa}	۰/۹۴	۰/۰۲۱±۰/۰۰۲^{Aa}	۰/۱۸۶±۰/۰۰۷^{Aa}	۰/۹۳	۱۵۰	۰/۱۶۸±۰/۰۰۷^{Aa}
۱۷۰	۰/۰۵۸±۰/۰۰۶^{Ab}	۰/۹۶	۰/۰۲۹±۰/۰۰۱^{Bb}	۰/۱۶۹±۰/۰۰۴^{ABa}	۰/۹۶	۱۷۰	۰/۱۵۹±۰/۰۰۷^{ABa}
۱۹۰	۰/۰۹۱±۰/۰۰۰^{Ac}	۰/۹۶	۰/۰۳۵±۰/۰۰۰^{Ac}	۰/۱۶۱±۰/۰۰۲^{Cb}	۰/۹۶	۱۹۰	۰/۱۵۴±۰/۰۰۳^{BCa}
0.5LPSGW							
۱۵۰	۰/۰۳۳±۰/۰۰۲^{Aa}	۰/۹۳	۰/۰۲۲±۰/۰۰۱^{Aa}	۰/۱۸۴±۰/۰۱۰^{Aa}	۰/۹۳	۱۵۰	۰/۱۶۵±۰/۰۰۷^{Aa}
۱۷۰	۰/۰۷۲±۰/۰۰۷^{ABb}	۰/۹۳	۰/۰۳۵±۰/۰۰۳^{ABb}	۰/۱۶۳±۰/۰۰۸^{Aa}	۰/۸۹	۱۷۰	۰/۱۵۲±۰/۰۰۸^{Aab}
۱۹۰	۰/۰۹۵±۰/۰۰۴^{Ac}	۰/۸۷	۰/۰۴۰±۰/۰۰۴^{Ab}	۰/۱۴۳±۰/۰۰۳^{Ab}	۰/۸۶	۱۹۰	۰/۱۳۹±۰/۰۰۳^{Ab}
1LPSGW							
۱۵۰	۰/۰۴۱±۰/۰۰۷^{ABa}	۰/۹۳	۰/۰۲۴±۰/۰۰۳^{Aa}	۰/۱۷۹±۰/۰۱۵^{Aa}	۰/۹۳	۱۵۰	۰/۱۶۴±۰/۰۰۶^{Aa}
۱۷۰	۰/۰۵۴±۰/۰۰۶^{Aa}	۰/۹۲	۰/۰۲۹±۰/۰۰۳^{Aa}	۰/۱۶۳±۰/۰۱۲^{ABa}	۰/۹۱	۱۷۰	۰/۱۵۵±۰/۰۰۷^{Ab}
۱۹۰	۰/۱۱۶±۰/۰۲۶^{Ab}	۰/۹۱	۰/۰۴۴±۰/۰۱۰^{Aa}	۰/۱۴۹±۰/۰۰۰^{Aa}	۰/۹۰	۱۹۰	۰/۱۴۵±۰/۰۰۶^{ABb}

* حروف بزرگ نماینگر اثر فرمولاسیون و حروف کوچک اثر درجه حرارت بر شاخص‌ها می باشد.

* ارقام دارای حروف مشترک در هر ردیف و ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.($p<0/05$).

* علامت (*) نشان بالاتر بودن میزان روغن سنجیده شده از میزان روغن تعادلی می باشد

منابع

انصاری فر،ا.، محبی،م.، شهیدی،ف. و وریدی، م. ۱۳۹۰، مدلسازی انتقال جرم طی سرخ کردن عمیق ناگت پنیر کردی پوشش داده شده با سفیده تخم مرغ.نشریه پژوهشهای علمی علوم وصنایع غذایی ایران. ۶ : ۱۲۶-۱۳۷

زمانی قلعه شاهی،ع. ۱۳۹۱.ارزیابی اثرصمغ‌های متیل سلولز و گزانتان بر میزان جذب روغن خلالهای سیب زمینی طیسرخ کردن عمیق. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

AACC, 1986, Moisture Content. In: approved methods of the American association of chemists. AOAC, 1990, Official methods Analysis. Association of official Analytical Chemists, *Washington* dC.

Adedeji, A.A., Ngadi, M.O., and Raghavan, G.S.V., 2009, Kinetics ofmass transfer in microwave precooked and deep fat friedchicken nuggets. *Journalof Food Engineering*, 91, 146–153.

Akdeniz, N., Sahin, S., Sumnu,G., 2006, Functionality of batters containing different gums for deep-fat frying of carrot slices. *Journal of Food Engineering*, 75, 522–526.

Albert, A., Perez-munuera, I., Quiles, A., Salvador, A., Fiszman,S.M., Hernando, I., 2009, Adhesion in fried battered nuggets ؛performance of different hydrocolloids as predusts usingthree cooking procedures. *Food Hydrocolloids*, 23,

1443–1448.

Amboon, W., Tulyathan, V., and Tattiyakul, J., 2010, Effect of hydroxypropyl methylcellulose on rheological properties, coating pickup, and oil content of rice flour-based batters. *Food and Bioprocess technology*, doi 007/s11947-010-0327-3.

Baixauli, R., Fiszman, S. M., Sanz, T., Salvador, A., 2003, Effect of the addition Dextrin or dried egg on therheological and textural properties of batters for fried foods. *Food hydrocolloids*, 17, 305-310.

Chen, C. L., li, P. Y., Hu, W.Y., Lan, M.H., Chen, M.J., and Chen, H.H., 2008, Using HPMC to improve crust crispness in microwave-reheated battered mackerel nuggets: water barrier effect of hpmc. *Food Hydrocolloids*, 22, 1337–1344.

Crank, J., 1975, the arithmetics of diffusion, second Ed. Oxford university press, oxford, UK

Dogan, S.F., Sahin, S., and Sumnu, G., 2005, Effects of soy and rice flour addition on batter rheology

Dehghan Nasiri, F., Mohebbi, M., Tabatabaee, Y. F., Haddad, M. H. K., 2011, Kinetic modeling of mass transfer during deep fat frying of shrimp nugget prepared without a pre-frying step. *Food and Bioproducts Processing*, 8 9, 241–247

Dogan, S.F., Sahin, s., and Sumnu, G., 2005, Effect of containing different protein types on the quality of deep-fat-fried chicken nuggets. *European Food Research and Technology*, 220, 502–508.

Duran, M., Pedreschi, F., Moyano, P., and Troncoso, E., 2007, Oil partition in pre-treated potato slices during frying and cooling. *Journal of Food Engineering*, 81, 257-265.

Hsia, H.Y., Smith, D.M. and Steffe, J.F., 1992, Rheological properties and adhesion characteristicsof flour-based batters for chicken nuggets as affected by three hydrocolloids.*Journal of Food Science*, 57(1), 18- 24.

Fiszman, S.M., Salvador, A., 2003, Recent developments in coatingbatters. Trends in Food Science and Food Technology, 14 (10),399–407.

Fernando, W.J.N., Low, H.C., Ahmad, A.L., 2011, Dependence of the effective diffusion coefficient of moisture with thickness and temperature in convective drying of sliced materials. A study on slices of banana, cassava and pumpkin. *Journal of Food Engineering*, 81, 257-265

Kim, C. and Yoo, B., 2006, Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures, *Journal of Food Engineering*, 75(1), 120-128.

Koocheki, A., Taherian, A., R., Bostan, A., 2009, Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from lepidium perfoliatum seeds. *Journal FoodHeydrocoloid*, 29, 297–302.

Koocheki A, Taherian A, R, M.A, Bostan A., 2013, Studies on the steady shear flow behavior and functional properties of lepidium perfoliatum seed gum. *Food research international* 50, 446–456.

Krokida, M.K., Oreopoulou, V., and Maroulis, Z.B., 2001, Water loss and oil uptake as a function of frying time. *Journal of Food Engineering*, 44, 39-4.

Moyano, P., and Pedreschi, F., 2006, Kinetics of oil uptake during frying of potato slices: effect of pre-treatments. Lwt-*Food Science and Technology*, 39, 285–291.

Mellema, M., 2003, A review, Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. *Trends in Food ScienceandTechnology*, 14, 364-373.

Moreira, R.G., Castell-perez, M.E., Barrufet, M.A., 1999, Deep-fat frying,Fundamentals and applications, aspen publishers, inc. *maryland*,u.s.a.; 1–2.

Ngadi, M.O., Dirani, K., and Oluka, S., 2006, Mass transfer characteristics of chicken nuggets. *International Journal of Food Engineering*, 2, 1-16.

Ngadi, M., Li, Y., and Oluka, S., 2007, Quality changes in chicken nuggets fried in oils with differentdegrees of hydrogenatation. Lwt – *Food Science and Technology*, 40, 1784–91.

Ngadi, M.O., Wang, V., Adedeji, A.A., and Raghavan, G.S.V., 2009, Effect of microwave pretreatment on mass transfer during deep-fat frying of chicken nugget. Lwt - *Food Science and Technology*, 42, 438–440.

Rimac-brncic, S., Lelas, V., Rade, D., Simundi, B., 2004, Decreasingof oil absorption in potato strips during deep fat frying.*Journal of Food Engineering*, 64, 237–241.

Salvador, A., Sanz, T., Fiszman, S.M., 2005, Effect of the additionof different ingredients on the characteristics of a battercoating for fried seafood prepared without a pre-frying step. *FoodHydrocolloids*, 19, 703–708.

Sanz, T., Salvador, A., Fiszman, S.M., 2008, Resistant starch (rs) in battered fried products: functionality and high-fibre benefit. *Food hydrocolloids*, 22, 543–549.

Sahin, S., Sumnu, G., Altunakar, B., 2005, Effects of batters containing different gum types on thequality of deep-fat fried chicken nuggets. *Journal of the Science of Food and agriculture*, 85(14), 2375–2379.

Sahin, S., and Sumnu, G., 2009, advance in deep-fat frying of foods. Taylor& Francis group.new york.

Saguy,I.S., Dana, D., 2006, Integrated approach to deep fat frying, Engineering, Nutrition, Health and consumer aspects. *Journal of Food Engineering*, 56, 143–152.

Soorgi, M., Mohebbi M., Mousavi S. M. & Shahidi F., 2012, the effect of methylcellulose, temperature and microwave pretreatment on kinetic of mass transfer during deep fat frying of chicken nuggets. *Food bioprocess technology*, vol 5, 5, 1521-1530.

Singh, R., Singh, G., and Chauhan, G.S., 1996, Effect of incorporation of defatted soy flour on the quality of biscuits. *Journal of food science and technology*, 33(4): 355–357.

Troncoso, E., and Pedreschi, F., 2009, Modeling water loss and oil uptake during vacuum frying of pre-treated potato slices. Lwt - *food science and technology*, 42: 1164–1173.

Xue. J., and Ngadi. M., 2006, Rheological properties of batter systems formulated using different flour combinations. *Journal of Food Engineering*, 77: 334–341.

Wolf, w. J., Cowan, j. C., 1975*, Soybeans as a food source*. Crc press, inc., Ohio , 34-51

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 512-525

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۵۲۵-۵۱۲

Kinetic modeling of mass transfer during deep fat frying of chicken nugget coated with batter containing Godume shahri seed gum/ soy protein isolates

H. Mahdavian Mehr[1], A. Koocheki[2]*, M. Mohebbi[3]

Received: 2015.07.21
Accepted: 2016.03.13

Introduction: Deep fat frying is a cooking method where oil is used as the heat transfer medium, in direct contact with food at a temperature above boiling point of water. The aim of this process is to combine short cooking times with unique characteristics. It also involves heat and mass transfer simultaneously. During frying time, the mass transfer is characterized by the dynamics moisture loss from the food and the fat uptake into the food. There is some experimental evidence showing that water loss and oil absorption are correlated and progress with specific kinetic. In the meantime, oil uptake of product is an important issue, affecting the nutritional and organoleptic qualities of fried foods. However, one problem associated with fried foods is the considerable amount of oil absorbed during the deep frying process. It is affected by oil temperature, frying time, initial water content of food ingredients, product surface area, the ratios of product weight to frying oil volume, pretreatments and many other factors. So far, several approaches have been suggested for decreasing oil uptake during deep frying of fried foods. One way to decrease oil absorption in foods is referred to batter coating. In this regard, the ingredients and flow behavior's properties of batter are the most important parameters to determine the performance of batter coating and reduction of oil uptake in the final product. In the batter formulations, proteins and gums can be used as important and effective components, because they have great water bonding and barrier properties, which has strong impact on reduction of oil uptake during frying. Therefore, the objective of the present study was to assess the effects of replacement of Godume shahri seed gum (0.5 and 1%) or soy protein isolates (2 and 4 %), as part of the wheat flour in batter formulation, on rheology of batter, batter pickup and mass transfer kinetic parameters during deep frying of chicken nuggets.

Materials and method:

Raw materials including fresh chicken breasts, onion, salt, hot pepper, wheat flour, baking powder, and 100% pure sunflower oil were purchased from local markets. SPI (92% protein. w/w, db) were obtained from FSL Co. The batter formulations consisted of wheat flour, salt (1.5% w/w, db), baking powder (0.5% w/w, db), SPI (2 and 4% w/v, db) and Godume shahri seed gum (0.5 and 1%). For all samples, water/dry mix proportion had always been 5:3.

Rheological properties of the batters were carried out using a Bohlin rotational Viscometer. For each test, shear rate increased from 0 to 300 s^{-1}. The flow behavior index (n) and consistency coefficient (k) values were computed by fitting the power law model.

The chicken nuggets, containing a mixture of chicken breast meat (88%), onions (10 %), Pepper (0.5%) and salt (1.5 %) were prepared in slab shapes using a manually operated cutting device. The dimensions of the chicken nuggets were about 4.5 cm (length) × 2.6 cm (width) ×1.1 cm (thickness) (±0.2 cm). Batter pickups (%) were calculated by the weight difference between the chicken nuggets after coating to the weight of chicken nuggets before coating.

Deep frying was performed in programmable deep fat fryer contained 1.5 L refined sunflower oil. Samples were placed in a wire basket and then submerged for the required times of zero, 1, 2, 3, 4 and 5 minutes at 150 ◦C, 170 ◦C, and 190 ◦C. Oil and moisture content of the chicken nuggets were determined by standard techniques. For modeling moisture and oil transfer phenomena in fried chicken nuggets, Fick's law of diffusion and a first order kinetic model were used respectively.

Results and Discussion:Results showed that Godume shahri seedgum had more effect on apparent viscosity compared with soy protein isolates. Polysaccharidic structure of Godume shahri seed gum prepares high number of hydroxyl groups. Hydrodynamic interactions between polar and hydrophobic groups trap most of the free water and consequently increase batter viscosity. All batters showed shear thinning behaviour ($n \geq 0.529$). The

1 , 2 and 3. MSc student, Associate Professor and Professor Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(*Corresponding Author Email: koocheki@um.ac.ir)

power law model was adequately suitable to describe the flow behavior of the batters ($R^2 \geq 0.994$). Coating uptake at the surface of nuggets was significantly affected by the batter consistency. The consistency index for batter containing gum was high and therefore the coating uptake was higher for these samples. The maximum moisture loss rate and the effective diffusion coefficient obtained for chicken nuggets coated with only batter. Addition of soy protein isolates and Godume shahri seed gum to batter formulation, decreased the D_{eff} to 3.55-5.46×10^{-8} m^2/s and 3.38-5.32×$10^{-8}$$m^2/s$, respectively. This can be attributed to the effect of different batter formulations and special functions of gum and protein. The activation energy to remove moisture and oil absorptionwere 10.79 (kJ/mol) and -7.91(kJ/mol) for the control sample, 13.37-17.64 (kJ/mol) and -5.90 to -9.18 (kJ/mol) for soy protein isolates and 11.9-14.7 (kJ/mol) and -7.56 to-10.30 (kJ/mol) for Godume shahri seed gum, respectively.

Keywords: Mass transfer; Deep frying; Godume shahri seed gum; Soy protein isolates; Chicken nugget.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 526-532

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۵۳۲-۵۲۶

کوتاه پژوهشی

بهینه‌سازی میزان کانژوگه شدن پروتئین‌های ایزوله سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد

ساره بوستانی[۱]، محمود امینلاری[۲*]، مرضیه موسوی نسب[۳]، مهرداد نیاکوثری[۳]، غلامرضا مصباحی[۴]

تاریخ دریافت:۱۳۹۳/۰۶/۰۴
تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۰۲/۲۱

چکیده

میزان کانژوگه شدن از عوامل مهم در بهبود عملکرد و پایداری حرارتی پروتئین‌های اصلاح شده از طریق واکنش طبیعی مایلارد می‌باشد. لذا در این مطالعه پروتئین‌های ایزوله سویا و دکستران تحت شرایط مختلف واکنش مایلارد در pHهای۷ و ۸/۵، دماهای ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، زمان‌های مختلف برای هر تیمار و رطوبت نسبی ۷۹٪ قرار گرفتند و تشکیل کانژوگه‌های پروتئین- پلی‌ساکارید با دو روش اسپکتوفتومتری OPA و میزان جذب UV با یکدیگر مقایسه و بررسی شدند. اندازه‌گیری میزان کانژوگه شدن با روش OPA (Ortho-phthaldialdehyde) نشان داد که افزایش دما، زمان و pH گرمخانه‌گذاری موجب افت بیشتری در میزان گروه‌های آمینی آزاد شده و در نتیجه میزان کانژوگه شدن افزایش می‌یابد. بالاترین میزان گانژوگه شدن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۸/۵ و زمان ۸ روز مشاهده شد. اندازه‌گیری میزان جذب ترکیبات حدواسط حاصل از واکنش مایلارد در طول موج ۲۹۴ نانومتر نتایج حاصل از روش OPA را تأیید کرد. نتایج تحقیق نشان می‌دهد که روش OPA و میزان جذب UV دو روش ساده، مناسب و با کارایی تقریباً مشابه جهت بررسی میزان کانژوگه شدن طی واکنش مایلارد می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: گرمخانه‌گذاری، جذب UV، روش OPA، میزان کانژوگه شدن

مقدمه

پروتئین‌های غذایی با وجود دارا بودن ارزش تغذیه‌ای بالا و خصوصیات عملکردی منحصر به فرد در مقابل حرارت، حلال‌های آلی و حملات آنزیمی، شیمیایی و فیزیکی بسیار حساس می‌باشند، لذا تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌ی طراحی پروتئین‌ها با خصوصیات عملکردی بهبودیافته، مقاومت بیشتر به حرارت و سایر عوامل آسیب‌رسان، خلق خصوصیات جدید و از بین بردن خصوصیات نامطلوب صورت گرفته است (Liu *et al,* 2012). روش‌های متفاوتی برای بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها با استفاده از اصلاح‌های شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی وجود دارد. این در حالیست که محققین صنایع غذایی همیشه به دنبال بهترین گزینه برای اصلاح پروتئین‌ها می‌باشند، بنابراین روش‌های اصلاح طبیعی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و یکی از راه‌های طبیعی اصلاح پروتئین‌های غذایی، واکنش بین پروتئین‌ها با پلی‌ساکارید ها می‌باشد، از جمله این اتصالات واکنش مایلارد می‌باشد (Liu *et al*, 2012; Oliver *et al*, 2006; Kato, 2002).

واکنش مایلارد در نتیجه اتصال کوالانسی بین گروه‌های آمینی آزاد پروتئین و انتهای کربونیلی پلی‌ساکارید رخ می‌دهد و منجر به تغییرات مطلوبی در پروتئین‌های غذایی می‌شود (Oliver *et al*, 2006; Kato, 2002). هیبریدهای بیوپلیمری در نتیجه حرارت‌دهی مخلوط پروتئین-پلی ساکارید تحت شرایط کنترل‌شده تشکیل می‌شوند و تأثیرات مثبتی بر پروتئین‌های غذایی دارد، به‌عنوان مثال باعث بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها از جمله خصوصیات حلالیت، جذب آب، خصوصیات کف‌کنندگی و امولسیفایری می‌شود، خصوصیات بافتی بهبود می یابد و پایداری حرارتی نیز بیشتر می شود (Amiri *et al*, 2008; Alahdad *et al*, 2009; Kato *et al*, 1992). بعلاوه خصوصیاتی چون فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدسرطانی و ضدجهش‌زایی و خصوصیات ضدمیکروبی نیز افزایش می‌یابد (Amiri*et al*, 2008; Lertittikul*et al*, 2007; Oliver *et al*, 2006; بوستانی و همکاران، ۱۳۹۵).

میزان کانژوگه شدن از مهمترین عوامل در تعیین عملکرد واکنش

۱، ۲، ۳ و۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
(* - نویسنده مسئول: Email: aminlari@shirazu.ac.ir)

مایلارد صورت گرفته به منظور اصلاح پروتئین می‌باشد و عوامل مختلفی بر میزان اتصال پروتئین به پلی‌ساکارید موثر است، از جمله: دما، pH، نسبت و نوع گروه‌های آمینی به قند، فعالیت آبی محیط، زمان، نوع پروتئین و پلی‌ساکارید شرکت‌کننده در واکنش و غیره می‌باشد. برای بدست آوردن نتایج مطلوب و بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها بایستی بهترین شرایط را جهت واکنش مایلارد انتخاب نمود (Oliver *et al*, 2006; Van Boekel, 2001). روش‌های مختلفی برای تعیین پیشرفت کانژوگه شدن وجود دارد از جمله این تکنیک‌ها می‌توان به الکتروفورز[1] SDS-PAGE، اسپکتروسکوپی FT-IR[2]، کروماتوگرافی[3]، انواع روش‌های رنگ سنجی با استفاده از اسپکتوفتومتر[4] و غیره را نام برد (Oliver *et al*, 2006).

تحقیقات متعددی در رابطه با بهبود پایداری حرارتی و خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها با استفاده از واکنش مایلارد صورت گرفته است. در حالی که در زمینه بررسی عوامل مختلف تأثیرگذار بر پیشرفت این واکنش و روش‌های مختلف تعیین میزان کانژوگه شدن مستندات کمی موجود است. بنابراین هدف این تحقیق کانژوگه کردن پروتئین‌های ایزوله سویا و دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد می‌باشد و در ادامه پیشرفت کانژوگه شدن با استفاده از روش‌های جذب‌سنجی اسپکتروسکوپی[5] مقایسه و بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

ایزوله پروتئینی سویا[6] ساخت چین و دکستران[7] با وزن ملکولی ۶۴۰۰۰–۷۶۰۰۰ دالتون (از شرکت سیگما آمریکا) تهیه شد و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت‌های معتبر تأمین‌کننده مواد آزمایشگاهی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه هیبریدهای پروتئین‌های سویا-دکستران

کانژوگه کردن پروتئین‌های ایزوله سویا در شرایط حرارت خشک انجام گرفت، بدین صورت که ابتدا پروتئین‌های سویا و دکستران به نسبت ۱ به ۴ در محلول بافر با pHهای ۷ و ۸/۵، تهیه و کاملاً مخلوط شدند، سپس نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند و توسط خشکن انجمادی[8] به پودر تبدیل شدند. پودرهای حاصله در دسیکاتور[9] با دما و زمان‌های مختلف در حضور برمید پتاسیم اشباع (رطوبت نسبی ۷۹٪) قرار گرفت تا واکنش مایلارد انجام شود. یک نمونه به‌عنوان شاهد که حاوی ترکیبات پروتئینی بدون پلی‌ساکارید است نیز در نظر گرفته شد، حالات مختلف بدین صورت بود که گرمخانه‌گذاری (آون Galenkamp مدل IH-100 انگستان و آون ISUZU مدل KM235 ژاپن) در دماهای ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد و به ترتیب در زمان‌های: ۰، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۲ روز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۸ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۰، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد، پیشرفت کانژوگه شدن نمونه‌ها با دو روش متفاوت جذبی اندازه‌گیری و مقایسه شدند.

تعیین میزان کانژوگه شدن با روش OPA[10]

برای بررسی میزان گروه‌های آمینی آزاد پروتئین از روش ارزیابی اسپکترومتری O-فتال دی آلدهید (OPA) استفاده شد. محلول OPA به‌صورت روزانه از مخلوط کردن ۲۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰۰ میلی‌مولار تتراهیدروبورات و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۲۰٪ وزنی/وزنی سدیم دودسیل سولفات و ۴۰ میلی‌گرم OPA (که در ۱ میلی‌لیتر اتانول حل شده است) و ۱۰۰ میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول بدست آمد که در نهایت با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر رسید. برای ارزیابی میزان گروه‌های آمینی آزاد، حدود ۵۰–۱۰۰ میکرولیتر از نمونه محلول به ۱ میلی‌لیتر از واکنشگر OPA درون یک کووت کوارتز[11] ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد. محلول حاصله به آرامی تکان داده و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و درصد جایگزینی (یا درصد کانژوگه شدن) مطابق فرمول زیر محاسبه شد (Nielsen *etal*, 2001). A_0 و A_T، به ترتیب میزان جذب نمونه قبل و بعد از گرمخانه‌گذاری در هر زمان تیمار می‌باشد.

$$\text{Conjugation degree (\%)} = (A_0-A_T/A_0)\times 100 \quad (۱)$$

تعیین میزان کانژوگه شدن با اندازه‌گیری جذب UV

اندازه‌گیری میزان جذب در ناحیه UV مطابق روش Lertittikul و همکاران (۲۰۰۷) و با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا نمونه‌ها به غلظت ۰/۲ درصد پروتئین در SDS ۱ درصد تهیه شدند و سپس میزان جذب در طول موج ۲۹۴ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر

1 Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
2 Fourier transform infrared spectroscopy
3 Chromatography
4 Spectrophotometer
5 Absorption spectroscopy methods
6 Soy protein isolate (SPI) (Pingdingshantianjing plant albumen CO.,LTD)
7 Dextran
8 Lyophilized
9 Desiccator
10 O-Phthaldialdehyde Assay
11 Quartz cuvette

مجهز به لامپ فرابنفش[1] خوانده شد. عدد ثبت شده به‌عنوان معیاری از میزان کانژوگه‌شدن محسوب شد و افزایش میزان جذب نشان از تشکیل بیشتر کانژوگه‌ها می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور آنالیز آماری داده‌ها و بررسی اطلاعات به‌دست آمده از آزمون‌های مختلف از طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شده و سپس میانگین و انحراف معیار بدست آمد. به‌منظور تعیین وجود اختلاف بین میانگین اعداد (سه تکرار هر آزمایش)، از آنالیز واریانس و برای گروه‌بندی آنها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

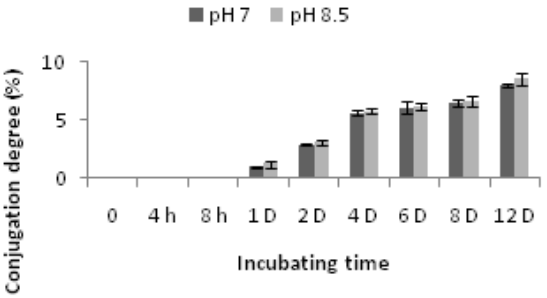
میزان یا درصد گلیکوزیله شدن از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های کانژوگه شده است به این علت که بطور مستقیم بر خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارد. تحت هر شرایط واکنش مایلارد، میزان گلیکوزیله شدن تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از جمله دمای واکنش، زمان و pH قرار می‌گیرد. اغلب اوقات تغییرات بدین صورت است که با افزایش وزن ملکولی پروتئین‌های کانژوگه شده در مقایسه با غیرکانژوگه‌ها همراه است. روش‌های مختلفی برای تشخیص میزان تغییرات وجود دارد. در این بخش اندازه‌گیری میزان کانژوگه شدن با دو روش OPA و جذب UV مقایسه و بررسی خواهد شد.

میزان کانژوگه شدن با روش OPA

گروه‌های فعال موجود در پروتئین‌ها مثل گروه‌های آمینی[2]، کربوکسیل[3]، سولفیدریل[4]، فنولیک[5]، تیواتر[6] و گوانیل[7] قادر به انجام واکنش با عوامل شیمیایی مختلف می‌باشند. بعضی از این واکنش‌ها قادر به تشخیص آبدوست یا آبگریز ملکول و همچنین خصوصیات عملکردی پروتئین یا پپتید می‌باشند و برخی دیگر قادر به تخمین میزان آمینواسید و یا گروه خاصی در آمینواسید می‌باشند. واکنش با OPA از جمله واکنش‌هایی است که به‌منظور اندازه‌گیری کمی آمینواسید بکار می‌رود. در این واکنش آمینو اسید با O-فتال دی آلدهید در حضور ۲-مرکاپتواتانول[8] واکنش داده و یک مشتق فلورسان[9] تولید می‌کند. جذب ترکیبات رنگی ایجاد شده در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده می‌شود و با استفاده از روابطی به میزان گروه‌های آمینی آزاد تبدیل می‌گردد. روش OPA یکی از روش‌های متداول اندازه‌گیری میزان کانژوگه شدن با استفاده از واکنش مایلارد می‌باشد (Damodaran, 1996).

میزان کانژوگه شدن پروتئین های ایزوله سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد در اشکال ۱-۳ نشان داده شده است.

همانگونه که مشاهده می‌شود نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در۴۰°C(شکل ۱) و ۸۰°C (شکل ۳) در هر دو pH ۷ و ۸/۵، تعداد گروه‌های آمینی در طول گرمخانه‌گذاری کاهش قابل توجه‌ای نداشته و بنابراین میزان کانژوگه شدن در این نمونه‌ها کم می‌باشد. ناپدید شدن گروه‌های آمینی در ۶۰°C بیشتر از ۴۰ و ۸۰ °C می‌باشد (شکل ۲). درصد کانژوگه شدن در نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در ۶۰°C و در pHهای ۷ و ۸/۵ ، در مقایسه با نمونه شاهد نشان می‌دهد که مقادیر گروه‌های آمینی آزاد در همه نمونه‌های کانژوگه شده کاهش یافته است و با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری محتوی گروه‌های آمینی آزاد کمتر می‌شود و بنابراین میزان کانژوگه شدن افزایش می‌یابد (Chevalier *et al*, 2001;Diftis and Kiosseoglou, 2006; Van de Lagemaat *et al*, 2007).



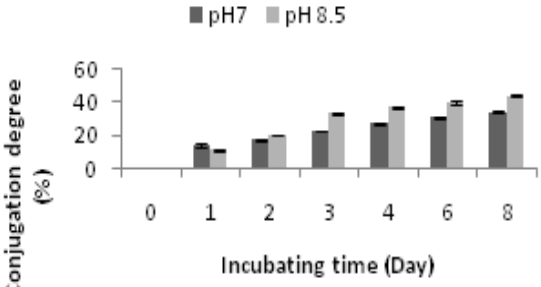
شکل۱- میزان کانژوگه شدن نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۰°C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان‌های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)

نتایج گروه‌های آمینی آزاد تشکیل بهتر محصولات واکنش مایلارد[10] را در نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در ۶۰°C و به ویژه در pH=۸/۵ را نشان می‌دهد (شکل ۲)، وقتی که پروتئین‌های سویا برای مدت ۸ روز در ۶۰°C و در pH=۸/۵ گرمخانه‌گذاری می‌شود، کاهش قابل توجهی در مقادیر گروه‌های آمینی آزاد پروتئین رخ

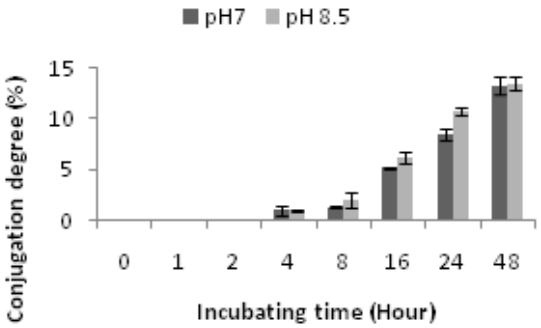
1Uv-visible spectrophotometer
2 Amino groups
3 Carboxyl
4 Sulfhydryl
5 Phenolic
6Thioether
7Guanyl

8 2-Mercaptoethanol
9 Fluorescent compound
10Maillard reaction products (MRP)

می‌دهد. درصد گلیکوزیله شدن در نمونه شاهد صفر و در این نمونه ۴۴/۲۳ درصد می‌باشد، بدین معنی که در این شرایط قسمت اعظم گروه‌های آمینی آزاد قابل اندازه‌گیری با این روش، با دکستران واکنش داده و گلیکوکانژوگه‌های سنگین را تولید می‌کند.



شکل ۲- میزان کانژوگه شدن نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای۶۰°C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)



شکل ۳ –میزان کانژوگه شدن نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۸۰ °C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)

میزان کانژوگه شدن با روش جذب UV

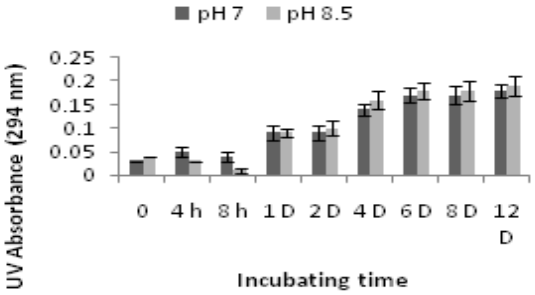
از دیگر روش‌های تشخیص و تخمین کمی میزان کانژوگه شدن تعیین میزان جذب ترکیبات در طول موج ناحیه UV می‌باشد. کینتیک جذب UV و زمان گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها در اشکال ۴-۶ ارائه شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود با افزایش pH میزان جذب در تمامی نمونه‌ها افزایش می‌یابد (pH ۸/۵ در مقایسه با pH ۷)، بعلاوه افزایش دما موجب افزایش میزان جذب می‌شود (دمای ۶۰°C در مقایسه با ۴۰ °C). نتایج حاصله در این بخش با نتایج گزارش شده توسط Ajandouz و همکاران (۲۰۰۸) مبنی بر افزایش میزان جذب UV با افزایش دما و pH در تشابه است، ایشان کانژوگه شدن گلوکز با پروتئین‌های سرم آلبومین گاوی و کازئین را مورد مطالعه و بررسی قرار دادند. افزایش زمان گرمخانه‌گذاری نیز موجب افزایش میزان جذب UV می‌شود.

Lertittikul و همکاران (۲۰۰۷) با کانژوگه کردن پروتئین پورسین پلاسما[1] و گلوکز، همچنین مولایی فر و همکاران (۱۳۹۵) با کانژوگه کردن لیزوزیم و مالتودکسترین با استفاده از تیمار مایکروویو[2] نتایج مشابهی مبنی بر افزایش میزان جذبUV با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری مشاهده کردند.

ترکیبات حد واسط[3] تولید شده طی واکنش مایلارد از جمله دی و پلی کربونیل[4] جذب بالایی در این ناحیهUV دارند. تشکیل بیشتر ترکیبات حاصل از واکنش مایلارد (MRP) در pHهای بالاتر تأیید می‌کند که تولید ترکیبات حد واسط در pHهای قلیایی مطلوبتر است. مطابق نتایج با افزایش زمان حرارت‌دهی میزان جذب درناحیه UVافزایش یافته و بالاترین میزان جذب در نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۸ روز در ۶۰°C و در pH=۸/۵ مشاهده شد (شکل ۵).نتایج بدست آمده در این بخش تأییدی بر تعیین میزان کانژوگه شدن با روش OPA می‌باشد.

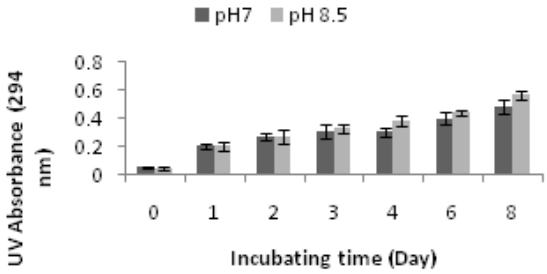
نتیجه‌گیری

در این تحقیق پروتئین‌های سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد کانژوگه شد و میزان کانژوگه شدن با دو روش مقایسه و بررسی گردید. نتایج روش OPA نشان داد بیشترین کانژوگه شدن در دمای۶۰°C، pH=۸/۵ و زمان ۸ روز و به میزان اتصال ۴۴/۲۳ درصد رخ داده است. بررسی میزان جذب در ناحیه UV نتایج حاصل از روش OPA را تأیید کرد. گرمخانه‌گذاری پروتئین‌های سویا با دکستران به نسبت ۱ به ۴ در دمای ۶۰ °C، pH=۸/۵، زمان ۸ روز و رطوبت نسبی ۷۹٪ جهت انجام واکنش مایلارد یکی از راه های مناسب اصلاح این پروتئین ها جهت کاربرد های گسترده تر در صنایع غذایی می باشد.

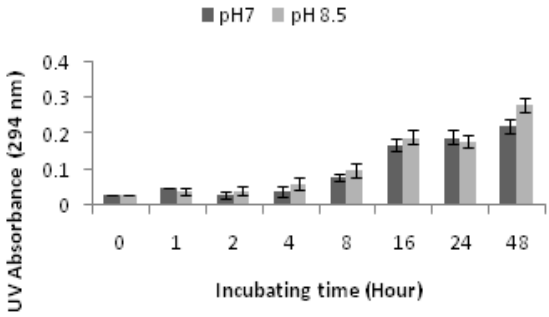


شکل٤- میزان جذب UV نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۰ °C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان‌های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)

1 Porcine plasma protein
2 Microwave
3 Intermediate products
4 di- and poly-carbonylcompounds



شکل ۵- میزان جذب UV نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای۶۰°C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان‌های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)



شکل ٦ - میزان جذب UV نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۸۰°C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان‌های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)

منابع

بوستانی، س.، امینلاری، م.، موسوی نسب، م.، ۱۳۹۵، بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین های سویای رسوب‌یافته با اسید از طریق کانژوگه شدن با مالتودکسترین با استفاده از واکنش مایلارد، فصل نامه علوم و صنایع غذایی، ۱۳، ۹۳-۱۰۲.

مولایی فر، م.ح.، امینلاری، م.، نیاکوثری، ن.، بوستانی، س.، ۱۳۹۵، تأثیر تیمار مایکروویو بر میزان گلیکوزیله شدن کانژوگه‌های حاصل از واکنش مایلارد لیزوزیم-مالتودکسترین، فصل نامه علوم و صنایع غذایی، ۱۳، ۱۰۵-۱۱۳.

Amiri, S. Ramezani, R. andAminlari, M., 2008. Antibacterial activity of dextran conjugated lysozyme against Escherichia coli and Staphylococcus aureus in cheese curd. *Journal of Food Protection*., 71, 411-415.

Ajandouz, E, Desseaux, V, Tazi, S. and Puigserver, A., 2008, Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation,protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems, *Food Chemistry*, 107, 1244–1252.

Alahdad, Z. Ramezani, R. Aminlari, M. and Majzoobi.M., 2009.Preparation and properties of dextran Sulfate-Lysozyme Conjugate.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6449–6454.

Chevalier, F. Chobert, J. M. Popineau, Y. Nicolas, M. G. and Haertlé, T., 2001. Improvement of functional properties of β-lactoglobulinglycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, 11, 145–152.

Diftis, N. and Kiosseoglou, V., 2006. Stability against heat-induced aggregation of emulsions prepared with a dry-heated soy protein isolate–dextran mixture. *Food Hydrocolloids*, 20, 787–792.

Damodaran, S., 1996, Amino acids, peptides, and proteins. In: Food Chemistry. pp.321-429. Fennema, O. R., Ed., *Marcel Dekker*, New York

Kato, A. Mifuru, R. Matsudomi, N. and Kobayashi, K., 1992. Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating.Bioscience, *Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 567–571.

Kato, A., 2002. Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food ScienceandTechnology Research*, 8, 193-199.

Lertittikul, W. Benjakul, S. and Tanaka, M., 2007. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 100, 669–677.

Liu, Y., Zhao, G., Zhao, M., Ren, J. and Yang, B., 2012. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction. *Food Chemistry*, 131, 901-906.

Nielsen, P. M. Petersen, D. and Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66, 642–646.

Oliver, C. M. Melton, L. D. and Stanley, R. A., 2006.Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 337–350.

Van Boekel, M. A. J. S., 2001. Kinetic aspects of the Maillard reaction: A critical review. Nahrung, 45, 150-159.

Van de Lagemaat, J. Manuel Silván, J. Javier Moreno, F. Olano, A. and Dolores del Castillo, M., 2007. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins, *Food Research International*, 40, 153–160.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 526-532

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۵۳۲-۵۲۶

Brief report

Optimizing the glycation extent of SPI-dextran conjugates produced by different Maillard reaction conditions

S. Boostani[1*], M. Moosavi-nasab*[2], M. Aminlari[2&3], M. Niakosari[4], Gh. Mesbahi[5]

Received: 2014.10.30
Accepted: 2015.10.13

Introduction: Engineering of food proteins with improved functional properties and higher resistance to heat is the main goal of food scientists. Food technologists are always seeking for innovative, simple and effective methods to manipulate proteins, hence natural modification has had the most attention in last decades. One of the natural ways used for protein modifications isMaillard grafting reaction. Maillard reaction as a consequence of covalentbindingbetween the available amino groups of the proteins and carbonyl containing moiety of the polysaccharides, causes a loss in free amino group content of the mixture that can be measured through different methods. Protein-polysaccharide hybrids, as a result of dry heating of two biopolymers mixture under controlled reaction conditions, cause the emergence of conjugates with novel functionalities.Selecting appropriate reaction conditions has a significant impact on the properties of the final conjugates. Among the factors affecting the degree of conjugation, temperature, pH and incubation time have considerable roles in determining the degree of conjugation. There are various methods by which conjugation degree can be assessed and factors such as accuracy, cost, accessibility and *etc*. must be considered when selecting a measuring method. Therefoe, in this study the effect of different Maillard reaction conditions on the conjugation degree of soy proteins-dextran heated mixtures have been investigated. In addition, the glycation degree was compared and reported by both OPA assay and UV absorbance methods.

Materials and methods: Soy proteins–dextran conjugates were prepared as described later. First, soy proteins and dextran were mixed with phosphate buffer (0.1 M, pH: 8.5 and 7) and 1 to 4 ratio of protein to polysaccharide. After mixing and incubating at ambient temperature for some hours, solutions were frozen at –80 ℃ and freeze dried. Then, the lyophilized powder was incubated at 40 ℃ for 0, 4, 8, 24 hours and 2, 4, 6, 8, 12 days, at 60 ℃ for 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 days and at 80 ℃ for 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 hours, under the 79 percent relative humidity in presence of saturated KBr. For each treatment a non conjugated sample was prepared in the exact same condition. Conjugation of proteins to polysaccharides was monitored by two methods (OPA assay and UV absorbance). Determining degree of glycation by OPA method was done as follows, in this procedure the level of available amino groups was estimated using the ortho- phthaldialdehyde (OPA) reagent, the absorbance was measured at 340 nm and degree of glycation was measured using a formula. To investigate the UV absorption of conjugated proteins, the samples were diluted using distilled water and the absorption was read using a UV-visible spectrophotometer.

Results & Discussion: Covalent linkage between amino group of proteins and carbonyl group of polysaccharides causes depletion in the amount of available amino groups. The extent of soy proteins-dextran conjugation under various Maillard reaction conditions was evaluated by the reduction of available amino groups of proteins, the more reduction in amount of amino groups, the more conjugation between protein and polysaccharide. OPA results showed that, in the samples heated at 40 °C and 80 °C (at both pH 7 and 8.5), the

1.Ph.D candidate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran,
2. Professor, Department of Food Science and Technology and Sea Food Processing Research Group, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz.
2&3Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
4. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
5. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
(*Corresponding author: E-mail: mosavi@shirazu.ac.ir)

amount of free amino groups slightly reduced compared to 60 °C heated samples. The disappearance of available amino groups at 60°C was faster than other temperatures and formation of conjugates in this temperature was more successful. A stepwise reduction in free amino group content observed with increasing incubation time. When soy proteins were incubated at pH 8.5 for 8 days at 60 °C, a considerable decrease in available amino group contents occurred. UV absorption results showed similar trend of changes in OPA method. Increasing UV absorption is due to the intermediate Maillard reaction products (MRP). Increasing incubation time, temperature and pH cause a significant increase in UV absorbance. Increasing UV absorption with increasing heating time indicates the fact that Maillard reaction products (MRP) formation is more favorable at alkaline pH. Data of UV absorption are a proper evidence for OPA assay results.

Conclusion: As a conclusion, both OPA assay and UV absorption methods are cost effective, accurate and simple methods which can represent valuable information concerning the Maillard conjugation.

Key words: Conjugation degree, Incubation, OPA method, UV Absorbance

Contents

Evaluation of the effect of *Aspergillus flavus* inoculation on fatty acids, proxide value and aflatoxin production in four common varieties of peanut cultivated in Golestan province 402
M. Ebrahimi - M. Khomeiri- Y. Maghsodlo
ffect of cultivar, osmosis, packaging and storage temperature on quantitative and qualitative characteristics of dried melon 414
Sh. Nikkhah- N. Sedaghat
Effect of edible composite coatings on shelf life of roasted pistachio nuts 427
N. Sedaght - S. Khoshnoudi-nia
Studying on the effect of Arabic gum, Milk protein concentrate and Whey protein concentrate on the quality indices of synbiotic yoghurt supplemented with transglutaminase 437
A. Saleh - M. Rezazad Bari - M. Alizadeh - N. Sabahi
Evaluation of antimicrobial activities of lactic flora isolated from production stages of Maskeh against food indicator bacteria 452
M. R. Edalatian Dovom- M. Yavarmanesh- F. GhiamatiYazdi- M. Khomeiri- N. Nayyeri
Physicochemical and functional properties of acid precipitated soy proteins-maltodextrin conjugates 462
S. Boostani- M. Moosavi-nasab - M. Aminlari - M. Niakosari- GH. R. Mesbahi
A comparative study on stability and functional properties of the proteins isolated from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dark muscle by acid-aided and alkaline-aided processes 476
Narjes Kamali-Damavandi- Amir Reza Shaviklo- Ali Motamedzadegan
Antioxidant properties of extract 's*Boswellia Serrata* oleo-gum resin in soyabean oil 488
Adeleh Mohammadi - Saeedeh Arabshahi- Delouee
The determination of antioxidant activity, total polyphenols and microbial total count of functional flavored milk containing pomegranate peel extract and date datesyrup during cold storage 498
R. Kazemizadeh- V. Fadaei Noghani
Microencapsulation of Spearmint (*MenthaSpicata*) 511
Oil using spray drying Method
S. Hosseinzadeh- A. Bostan- M. H. Hddad Khodaparast- M. Mohebbi
Kinetic modeling of mass transfer during deep fat frying of chicken nugget coated with batter containing Godume shahri seed gum/ soy protein isolates 525
H. Mahdavian Mehr- A. Koocheki- M. Mohebbi
Brief report
Optimizing the glycation extent of SPI-dextran conjugates produced by different Maillard reaction conditions 532
S. Boostani- M. Moosavi-nasab- M. Aminlari - M. Niakosari- Gh. Mesbahi

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 12 No. 4 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 No.4

2016

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Iranian food science and technology Association

ISSN:1735-4161

Contents

Evaluation of the effect of Aspergillus flavus inculation on fatty acids, proxide value and Aflatoxin production in four common varieties of peanut cultivated in Golestan province 402
M. Ebrahimi - M. Khomeiri- Y. Maghsodlo

Effect of cultivar, osmosis, packaging and storage temperature on quantitative and Qualitative characteristics, of dried melon 414
Sh. Nikkhah- N. Sedaghat

Effect of edible composite coatings on shelf life of roasted pistachio nuts 427
N. Sedaght - S. Khoshnoudi-nia

Studying on the effect of Arabic gum, Milk protein concentrate and Whey protein concentrate on the quality indices of synbiotic yoghurt supplemented with transglutaminase 437
A. Saleh - M. Rezazad Bari - M. Alizadeh - N. Sabahi

Evaluation of antimicrobial activities of lactic flora isolated from production stages of Maskeh against food indicator bacteria 452
M. R. Edalatian Dovom- M. Yavarmanesh- F. GhiamatiYazdi- M. Khomeiri- N. Nayyeri

Physicochemical and functional properties of acid precipitated soy proteins-maltodextrin conjugates 462
S. Boostani- M. Moosavi-nasab - M. Aminlari - M. Niakosari- GH. R. Mesbahi

A comparative study on stability and functional properties of the proteins isolated from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dark muscle by acid-aided and alkaline-aided processes 476
Narjes Kamali-Damavandi- Amir Reza Shaviklo- Ali Motamedzadegan

Antioxidant properties of extract 's*Boswellia Serrata* oleo-gum resin in soyabean oil 488
Adeleh Mohammadi - Saeedeh Arabshahi- Delouee

The determination of antioxidant activity, total polyphenols and microbial total count of functional flavored milk containing pomegranate peel extract and date datesyrup during cold storage 498
R. Kazemizadeh- V. Fadaei Noghani

Microencapsulation of Spearmint (*MenthaSpicata*) Oil using spray drying Method 511
S. Hosseinzadeh- A. Bostan- M. H. Hddad Khodaparast- M. Mohebbi

Continue Content in cover