نشریه علمی

پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران

Iranian food science and technology Association

دانشگاه فردوسی مشهد

جلد ۱۸ شماره ۲

سال ۱۴۰۱

شماره پیاپی ۷۴

شاپا: ۱۷۳۵-۴۱۶۱

عنوان مقالات

تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه بر استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با استفاده از التراسونیک: طراحی تجربی فاکتوریل و روش مدلسازی سطح پاسخ ۱۸۱
زرین نصری

بررسی اثر جایگزینی آرد گندم با پودر ماش بر ویژگی‌های بافتی، فیزیکوشیمیایی وحسی کیک اسفنجی ۱۹۷
فریبا عطایی نوکابادی- نرگس نهچیری- جواد کرامت- منوچهر مومنی شهرکی

بررسی ترکیبات شیمیایی، گروه‌های عاملی زیست‌فعال، قدرت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولیHT29: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی ۲۰۵
الناز صفاری سامانی- حسین جوینده- بهروز علیزاده بهبهانی

بررسی اثر سینرژیستی عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین بر ویژگی‌های شیمیایی سس مایونز ۲۲۱
زینب ابرچائی- علیرضا رحمن- مریم فهیم دانش

مدل‌سازی و بهینه‌سازی استخراج اسانس رزماری به کمک مایکروویو با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) ۲۳۷
بهمن ساعدپناه- ناصر بهروزی خزاعی- جلال خورشیدی

بررسی اثر افزودن پپتید زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر ویژگی‌های کیفی دوغ ۲۵۱
نفیسه کریمی- رضوان پوراحمد- سلمان طاهری- اورنگ عیوض‌زاده

اثر کاربرد سینامیک اسید بر ماندگاری و کیفیت قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت ۲۶۵
حدیث چراغی- فردین قنبری- مهدی صیدی

بهینه‌سازی کاربرد سیال مادون بحرانی آب در فرآیند استخراج ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی از پوست پسته و بررسی ویژگی‌های رادیکال گیرندگی عصاره‌های آن ۲۷۹
مرتضی محمدی- محمد قربانی- علیرضا صادقی ماهونک- عادل بیگ بابائی- سمیرا یگانه‌زاد

تاثیر نسبت روغن و مقدار امولسیفایر بر خصوصیات نانوامولسیون روغن دانه چیا ۲۹۷
سارا فروزنده- محمد فاضل

تولید دونات کم‌چرب با استفاده از آرد تریتیکاله و صمغ ریحان ضمن بررسی تأثیر اسانس هل سبز بر ماندگاری آن ۳۰۹
زهرا شیخ‌الاسلامی- مهدی کریمی- بهاره صحرائیان

ارزیابی تأثیر پلاسمای غیرحرارتی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد گندم ۳۳۱
سیدامیر توکلی لاهیجانی- فخری شهیدی- محمود حبیبیان- آرش کوچکی

ادامه فهرست داخل جلد

نشریه علمی پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران جلد۱۸ شماره ۲ سال ۱۴۰۱ 2022 No.2 Vol.18 Iranian Food Science and Technology Research Journal

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 ۱۸ شماره ۲ خرداد- تیر ۱۴۰۱

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: دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: دکتر ناصر شاهنوشی — استاد، اقتصاد کشاورزی (دانشگاه فردوسی مشهد)

سردبیر: دکتر فریده طباطبایی — استاد، میکروبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد

اعضای هیئت تحریریه:

دکتر سید علی مرتضوی — استاد، میکروبیولوژی وبیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر فخری شهیدی — استاد، میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر محمدباقر حبیبی نجفی — استاد، میکروبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
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 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 — استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دکتر آرش کوچکی — استاد، تکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر محبت محبی — استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر بابک قنبرزاده — استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه تبریز
دکتر ایران عالم‌زاده — استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه صنعتی شریف
دکتر قدیر رجب‌زاده اوغاز — دانشیار، نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی
دکتر مهیار حیدرپور — دانشیار، زیست مولکولی، دانشکده پزشکی هاروارد
دکتر حمید بهادر قدوسی — دانشیار، میکروبیولوژی غذایی، دانشگاه متروپولیتن لندن
دکتر کیانوش خسروی — استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر مرتضی عباس‌زادگان — استاد، ویروس شناسی، دانشگاه آریزونا
دکتر محمدامین محمدی‌فر — استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه دانمارک
دکتر منوچهر وثوقی — استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه صنعتی شریف
دکتر هادی الماسی — دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
دکتر میلاد فتحی — دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان
دکتر سلیمان عباسی — استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس.
دکتر نونو بورخس — استاد، گروه علوم تغذیه و مواد غذایی، دانشگاه پورتو، پرتغال

ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد **چاپ:** چاپخانه دانشگاه فردوسی مشهد

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**

بسم الله الرحمن الرحیم

مندرجات

تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه بر استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با استفاده از التراسونیک: طراحی تجربی فاکتوریل و روش مدلسازی سطح پاسخ ۱۸۱

زرین نصری

بررسی اثر جایگزینی آرد گندم با پودر ماش بر ویژگی‌های بافتی، فیزیکوشیمیایی وحسی کیک اسفنجی ۱۹۷

فریبا عطایی نوکابادی- نرگس نهچیری- جواد کرامت- منوچهر مومنی شهرکی

بررسی ترکیبات شیمیایی، گروه‌های عاملی زیست‌فعال، قدرت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولیHT29: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی ۲۰۵

الناز صفاری سامانی- حسین جوینده- بهروز علیزاده بهبهانی

بررسی اثر سینرژیستی عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین بر ویژگی‌های شیمیایی سس مایونز ۲۲۱

زینب ابرچائی– علیرضا رحمن- مریم فهیم دانش

مدل‌سازی و بهینه‌سازی استخراج اسانس رزماری به کمک مایکروویو با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) ۲۳۷

بهمن ساعدپناه- ناصر بهروزی خزاعی- جلال خورشیدی

بررسی اثر افزودن پپتید زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر ویژگی‌های کیفی دوغ ۲۵۱

نفیسه کریمی- رضوان پوراحمد- سلمان طاهری- اورنگ عیوض‌زاده

اثر کاربرد سینامیک اسید بر ماندگاری و کیفیت قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت ۲۶۵

حدیث چراغی- فردین قنبری- مهدی صیدی

بهینه‌سازی کاربرد سیال مادون بحرانی آب در فرآیند استخراج ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی از پوست پسته و بررسی ویژگی‌های رادیکال گیرندگی عصاره‌های آن ۲۷۹

مرتضی محمدی- محمد قربانی- علیرضا صادقی ماهونک- عادل بیگ بابائی- سمیرا یگانه‌زاد

تاثیر نسبت روغن و مقدار امولسیفایر بر خصوصیات نانوامولسیون روغن دانه چیا ۲۹۷

سارا فروزنده- محمد فاضل

تولید دونات کم‌چرب با استفاده از آرد تریتیکاله و صمغ ریحان ضمن بررسی تأثیر اسانس هل سبز بر ماندگاری آن ۳۰۹

زهرا شیخ‌الاسلامی- مهدی کریمی- بهاره صحرائیان

ارزیابی تأثیر پلاسمای غیرحرارتی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد گندم ۳۳۱

سیدامیر توکلی لاهیجانی- فخری شهیدی- محمود حبیبیان- آرش کوچکی

بررسی خصوصیات هم‌افزایی و هم‌ستیزی عصاره جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ در روغن زیتون بکر ۳۴۵

ساناز فلاح تفتی‌زاده- غلامرضا عبدی- فاطمه زنده بودی- مهدی محمدی

تاثیر عصاره آبی چای سفید بر مقاومت حرارتی روغن کنجد تولید شده با استفاده از پرس سرد ۳۶۹

صدیقه یزدان‌پناه- سارا محمدی- امیرحسین الهامی‌راد

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 179- 194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 18، شماره 2، خرداد-تیر 1401 ص.194-179

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

CC BY

Full Research Paper

Particle size and root diameter effects on the extraction of glycyrrhizic acid from licorice using ultrasonic: Full factorial experimental design and response surface methodology

Zarrin Nasri[1*]

Received: 2020.11.02
Accepted: 2021.02.27

How to cite this article:
Nasri, Z. (2022). Particle size and root diameter effects on the extraction of glycyrrhizic acid from licorice using ultrasonic: Full factorial experimental design and response surface methodology. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 179-194.

Abstract

Introduction: Licorice is one of the most important medicinal plants in the world. This plant has been used in the world for more than 2000 years and is applied in various industries including pharmaceutical, food and tobacco industries. Iran is one of the best regions in the world in terms of medicinal plants. The roots of the licorice plant are widely used in the food and pharmaceutical industries. These roots are strong natural sweeteners, about 50-170 times sweeter than sucrose. The value of this plant is related to its chemical components. Glycyrrhizin is the most abundant component of this plant and is present in licorice in the form of potassium or calcium salt of glycyrrhizic acid and is considered as an indicator of licorice quality. In recent years, novel extraction methods with different energy sources have been proposed for improving extraction efficiency. Higher extraction efficiencies can be achieved by using microwave, ultrasonic and high pressure methods. In the ultrasonic extraction method, the extraction rate increases due to the presence of cavitation. The cavities formed in the solvent grow and then collapse rapidly, releasing a large amount of energy that increases the local temperature and pressure. Therefore, the solvent penetrates more into the plant cell material and the contents of the plant cells are released into the solvent medium. Also, physical effects such as liquid circulation and turbulence produced by cavitation help to increase the contact surface between the solvent and the plant particles and lead to more solvent penetration into the plant matrix.

Materials and Methods: The aim of this study is to statistically investigate the effect of particle size and licorice root diameter on the rate of glycyrrhizic acid extraction using ultrasonic. The full factorial experimental design method and response surface methodology have been used to determine the levels of the parameters and to model the responses, respectively. Independent variables included particle size of licorice root at three levels (35-60, 60-120, ≥ 120 mesh) and licorice root diameter is at three levels (1-2, 2-3, ≥3 cm). Total extract and glycyrrhizinic acid yield are considered as response variables. The solvent used was ammonia and the analysis of glycyrrhizic acid in the extract was performed by HPLC method. The licorice root used in this research was from Bojnourd region. Monoammonium glycyrrhizic acid (99.5%) was purchased as an HPLC standard from Sigma and ammonia from Merck. The method of glycyrrhizic acid extraction from licorice root was based on the British Pharmacopoeia method in this research.

Result and Discussion: The results showed that regarding the response glycyrrhizic acid yield, the parameter licorice root diameter had a significant effect on the response, but the particle size parameter had no significant effect. Also, two parameters had interaction. Based on the modeling results of the extraction process, the optimal conditions for obtaining the maximum total extract of licorice root included particle size, 125 µm (120 mesh) and licorice root diameter, 3.28 cm, which leaded to 68.16 wt% total extract. The optimal response conditions for glycyrrhizic acid yield from licorice root included particle size, (120 mesh) and licorice root diameter, 2.72 cm, which leaded to the extraction of 6.02 wt%glycyrrhizic acid from the root. Also, a comparison was performed between glycyrrhizic acid extraction from licorice in ultrasonic bath and ultrasonic probe. The results showed that the amount of glycyrrhizic acid extraction

1 Assistant professor of Chemical Engineering, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), P.O. Box 33535111,Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: zn_nasri@yahoo.com, nasri@irost.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67074.0

was similar and was equal to 5.5 wt%. The effect of particle size distribution has also been investigated. According to the results in ultrasonic extraction, particle size distribution had a positive effect on extraction.

According to the results of this research, the parameter of licorice root diameter had a significant effect on the response of glycyrrhizic acid yield and with decreasing licorice root diameter, the amount of glycyrrhizic acid extraction increased. Also, the efficiency obtained by extraction method in ultrasonic bath is compared with ultrasonic probe. It can be concluded that glycyrrhizic acid extraction from licorice with using ultrasonic is an effective method for extraction.

Keywords: Licorice, Ultrasonic, Glycyrrhizic acid, Response Surface Methodology

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 179- 194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 18، شماره 2، خرداد-تیر 1401 ص.194-179

مقاله علمی-پژوهشی

تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه بر استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با استفاده از التراسونیک: طراحی تجربی فاکتوریل و روش مدلسازی سطح پاسخ

زرین نصری

تاریخ دریافت: 1399/08/12
تاریخ پذیرش: 1399/12/09

چکیده

در این پژوهش تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بر میزان استخراج اسید گلیسیریزیک با استفاده از التراسونیک بررسی شد. از روش طراحی تجربی فاکتوریل کامل و روش سطح پاسخ برای تعیین سطوح پارامترها و مدل کردن پاسخ استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل اندازه ذره ریشه شیرین بیان در سه سطح (120 ≤، 120-60، 60- 35 مش) و قطر ریشه شیرین بیان در سه سطح (3 cm ≤ 3 –2، 2 -1) بود. میزان عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک به‌عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی‌داری بر بازدهی اسید گلیسیریزیک داشت، در حالی که تاثیر معنی‌داری بر اندازه ذره مشاهده نشد. بر اساس نتایج مدلسازی فرایند استخراج، شرایط بهینه حداکثرسازی میزان عصاره کلی از ریشه شیرین بیان شامل اندازه ذره، 125 µm≤ (120 mesh ≤) و قطر ریشه شیرین بیان، 3/28 سانتی‌متر حاصل شد که منجر به استخراج عصاره کلی از ریشه شیرین بیان به میزان 68/16 درصد وزنی گردید. شرایط بهینه بازدهی اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان شامل اندازه ذره، 125 µm≤ (120 mesh ≤) و قطر ریشه شیرین بیان، 2/72 سانتی‌متر بود که منجر به استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان به میزان 6/02 درصد وزنی گردید. همچنین مقایسه بین استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان در حمام التراسونیک و با پراب التراسونیک نشان داد که میزان استخراج اسید گلیسیریزیک توسط پراب التراسونیک و در حمام التراسونیک مشابه و برابر با 5/5 درصد وزنی بود. به‌طور کلی از نتایج این پژوهش می‌توان ادعا کرد که روش سطح پاسخ یک روش مطمئن برای بهینه‌سازی شرایط فرایندی استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان با استفاده از التراسونیک است.

واژه‌های کلیدی: شیرین بیان، التراسونیک، اسید گلیسیریزیک، روش سطح پاسخ

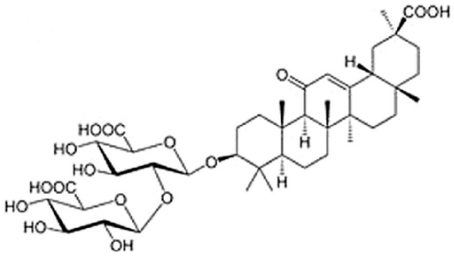
مقدمه

ایران یکی از بهترین منابع مهم گیاهان دارویی به‌لحاظ شرایط آب و هوایی در سطح جهانی است. شیرین بیان یکی از قدیمی‌ترین و محبوب‌ترین گیاهان دارویی در بسیاری از کشورهای آسیایی و اروپایی است. این گیاه برای بیش از 2000 سال در دنیا استفاده می-شود (Ming, 2007). ریشه‌های گیاه شیرین بیان شیرین‌کننده طبیعی قوی، حدود 170-50 برابر شیرین‌تر از ساکارز هستند. اجزاء شیمیایی ریشه این گیاه شامل گلیسیریزین (16٪)، قندهای مختلف (18٪)، فلاونوئیدها، ساپونوئیدها[2]، استرول‌ها، نشاسته‌ها، آمینواسیدها، صمغ‌ها و اسانس است (Ahmadi Hosseini et al., 2014). گلیسیریزین فراوانترین جزء این گیاه می‌باشد و به‌صورت نمک پتاسیم یا کلسیم اسید گلیسیریزیک در شیرین بیان موجود است و به‌عنوان شاخص کیفیت شیرین بیان محسوب می‌گردد (Ming, 2007). شکل 1 ساختارهای شیمیایی اسید گلیسیریزیک و گلیسیریزین را نشان می‌دهد (Noori et al., 2018).در سال‌های اخیر برای افزایش راندمان استخراج، از روش‌های استخراج نوینی مانند مایکروویو، التراسونیک و روش‌های فشار بالا استفاده می‌شود (Ming, 2007). در روش استخراج با التراسونیک نرخ استخراج به‌واسطه حضور کاویتاسیون افزایش می‌یابد. Pan و همکاران (2000) با استفاده از روش مایکروویو حداکثر بازدهی استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان را 3 درصد وزنی به‌دست آوردند. پارامترهای مورد بررسی شامل زمان استخراج، غلظت حلال، نسبت حلال به جامد و اندازه ذره بود. Mukhopadhyay و Panja (2008) استخراج اسید گلیسیریزیک را از ریشه شیرین بیان تحت فشار بررسی نمودند. حداکثر غلظت مونوآمونیوم گلیسیریزات در محلول استخراج از شیرین

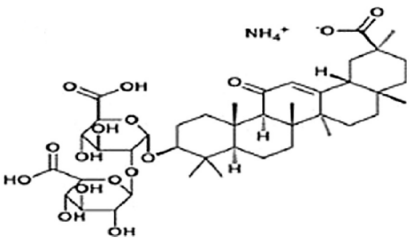
1- استادیار، گروه فناوری‌های شیمیایی سبز، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.
(* - نویسنده مسئول: Email: nasri@irost.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67074.0
2 Saponoids

بیان در شرایط 110 درجه سانتی‌گراد، فشار 5 اتمسفر، نسبت محلول آمونیاک به گیاه 40 ml/g و زمان استخراج 90 دقیقه حاصل شد و برابر با 13/6 درصد وزنی با روش رنگ سنجی با UV بود.

Charpe و Rathod (2012) استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان را با روش التراسونیک بررسی کردند. حداکثر بازدهی اسید گلیسیریزیک برابر با 36/4 mg/g به‌دست آمد. شرایط بهینه شامل زمان استخراج 10 دقیقه، نسبت حلال به حل‌شونده 1:30، درجه حرارت 40 درجه سانتی‌گراد و فرکانس 25 کیلوهرتز بود. آنها روش استخراج با التراسونیک را با روش‌های متداول شامل استخراج در یک ظرف همزن‌دار و استخراج با سوکسله مقایسه کردند و نتیجه گرفتند که روش التراسونیک منجر به کاهش زمان و بازدهی بالاتر گردید.



(الف) (a)



(ب) (b)

شکل 1- ساختارهای شیمیایی (الف) اسید گلیسیریزیک (ب) گلیسیریزین
Fig. 1. Chemical structures (a) glycyrrhizic acid (b) glycyrrhizin

Charpe و Rathod (2014) استخراج اسید گلیسیریزیک را از شیرین بیان با کمک التراسونیک بررسی کردند. شرایط بهینه شامل اتانول 50٪ به‌عنوان حلال، توان 230 وات، نسبت حلال به جامد 1:40، درجه حرارت 30^0C و فرکانس 40 کیلوهرتز بود که در این شرایط 95/69٪ استخراج در 20 دقیقه صورت گرفت. Hemati و همکاران (2015) تاثیر قطر ریشه را بر خواص آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، فلاونوئید کل و گلیسیریزین در ریشه شیرین بیان بررسی کردند. Shabkhiz و همکاران (2015) استخراج اسید گلیسیریزیک را از شیرین بیان تحت فشار بررسی کردند. بیشترین بازده استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان در فشار 15 بار و درجه حرارت 90 درجه سانتی‌گراد بود. آنها حداکثر استخراج اسید گلیسیریزیک را 51/570 میلی گرم بر گرم نمونه خشک به‌دست آوردند. Ahmadian و همکاران (2018) روش التراسونیک را در استخراج گلیسیریزین از شیرین بیان به دو صورت پیش التراسونیک (ابتدا التراسونیک و سپس حرارت) و پسا التراسونیک (ابتدا حرارت و سپس التراسونیک) استفاده کردند و نتایج را با یک روش اصلاح شده متداول (حرارت و جداسازی ناخالصی‌ها با حلال اتانول) مقایسه کردند. نتایج نشان داد که روش پساالتراسونیک و روش اصلاح شده متداول به‌ترتیب حداکثر و حداقل بازدهی استخراج را داشتند. Liao و همکاران (2016) پارامترهای توان، فرکانس، درجه حرارت و زمان را بر استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با استفاده از التراسونیک بررسی کردند. بالاترین مقدار اسید گلیسیریزیک برابر با 217/7 mg/g در شرایط بهینه شامل 125 وات، 55 کیلوهرتز، 25 درجه سانتی‌گراد و 10 دقیقه به‌دست آمد. Khanahmadi و همکاران (2018) گزارش کردند که بالاترین راندمان استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان 54/9% در شرایط زمان استخراج 17 ساعت، نسبت حلال به جامد 10 ml/g، pH 10 و درجه حرارت 60 درجه سانتی‌گراد به روش بهینه‌سازی سطح پاسخ بود.

مطالعات نشان داد که روش‌های استخراج متداول برای استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان دارای معایبی مانند زمان استخراج بالا، بازدهی کمتر و درجه حرارت استخراج بالاتر است (Charpe and Rathd, 2012). در این پژوهش بررسی آماری و مدل‌کردن تاثیر متغیرهای وابسته شامل اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بر میزان عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک در فرایند استخراج با روش التراسونیک ارزیابی شد. استخراج با التراسونیک در مقایسه با روش‌های متداول سریع‌تر است. این امر به‌واسطه شکست ذرات است که سطح تماس بین جامد و مایع را افزایش می‌دهد. مطالعات نشان داد که مدلسازی تاثیر قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره در استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با کمک التراسونیک تاکنون مطالعه نشده است. شرایط بهینه استخراج برای حداکثرسازی پارامترهای هدف با استفاده از مدل درجه دوم کاهش یافته توسط روش سطح پاسخ به‌دست آمد. مقایسه میان میزان استخراج اسید گلیسیریزیک

توسط حمام التراسونیک و پراب التراسونیک و همچنین تاثیر توزیع اندازه ذرات در میزان استخراج نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی شیرین بیان

ریشه شیرین بیان مورد استفاده در این پژوهش از منطقه بجنورد به صورت خشک تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفت. ریشه شیرین بیان دارای قطرهای مختلف شامل 3< cm، 3 -2، 2- 1 بود. ریشه-های شیرین بیان ابتدا آسیاب شده و سپس با استفاده از الک به پودرهای با اندازه‌های 120، 60 ، 35 مش سایزبندی شد. سپس در یک مکان سرد و تاریک تا زمان استفاده ذخیره گردید.

مواد شیمیایی و معرف‌ها

مونوآمونیوم گلیسیریزیک اسید با خلوص 99/5% به‌عنوان یک استاندارد HPLC از شرکت سیگما و آمونیاک از شرکت مرک خریداری شد.

فرایند استخراج

روش استخراج اسیدگلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان بر اساس روش British Pharmacopoeia (2009) در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. حلال مورد استفاده در مراجع جهت استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان آب، متانول، اتانول و آمونیاک است (Khanahmadi et al., 2018). در این پژوهش بر اساس روش British Pharmacopoeia (2009) از حلال آمونیاک استفاده شد. بر اساس این روش، به یک گرم ریشه شیرین بیان پودرشده با اندازه ذره مشخص، مقدار 100 میلی لیتر از محلول هیدروکسید آمونیوم (8 gr/lit) افزوده شد. سوسپانسیون حاصل سپس در حمام التراسونیک قرار داده شد. مدت زمان آزمایش در همه آزمایش‌ها ثابت و برابر با 30 دقیقه بود. استخراج با کمک التراسونیک در یک سیستم حمام التراسونیک با حجم 7 لیتر ساخت کشور ترکیه انجام گرفت. درجه حرارت به‌وسیله درجه حرارت آب در حمام التراسونیک کنترل گردید که می‌تواند سیرکوله شود و در درجه حرارت‌های مطلوب تنظیم گردد. در این پژوهش درجه حرارت مورد استفاده 70^0C بود. همچنین از سیستم پراب التراسونیک جهت مقایسه راندمان استخراج استفاده شد. دستگاه التراسونیک شامل پراب ساخت کشور آلمان با توان 250 وات بود. پس از آنکه استخراج صورت گرفت، سوسپانسیون حاصل فیلتر شد. سپس دو بار از عصاره مایع حاصل از استخراج نمونه‌برداری شده و در آون تا ثابت شدن وزن آن خشک شد و میزان عصاره خشک اندازه‌گیری شد. باقیمانده عصاره در شرایط سرد و خشک نگهداری شد تا آنالیز اسید گلیسیریزیک روی آنها انجام گیرد. مقادیر اسید گلیسیریزیک و جامدات کل نسبت به وزن خشک ریشه‌های شیرین بیان اندازه‌گیری شد.

جدول 1- مقادیر متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی تجربی استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان با روش التراسونیک

Table 1-The values of independent variables used for experimental design of glycyrrhizic acid extraction from licorice root by ultrasonic method

متغیرهای مستقل Independent variables	سطح Level 1	2	3
اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	120	60	35
متوسط قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) Average diameter of licorice root (cm)	1.5	2.5	3.5

روش آنالیز HPLC

آنالیز اسیدگلیسیریزیک با استفاده از دستگاه HPLC (Waters Company، امریکا) انجام شد. دستگاه شامل دو پمپ Waters 510 HPLC، آشکارکننده جذب قابل تنظیم Waters 486، آشکارکننده UV با طول موج 254 nm، ستون C18 و شیر تزریق Waters U6K بود. زمان اجرا برای جداسازی کروماتوگرافیک 45 دقیقه و زمان اقامت اسید گلیسیریزیک تقریبا 17/34 دقیقه بود. حجم تزریق برای همه آزمایش‌ها 10 میکرولیتر بود. پیک اسید گلیسیریزیک به‌وسیله مقایسه زمان اقامت با استانداردها شناسایی گردید. روش استانداردBritish Pharmacopoeia در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت (British Pharmacopoeia, 2009).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این مقاله به‌منظور بررسی تاثیر پارامترهای مستقل بر روی فرایند استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان با التراسونیک از روش سطح پاسخ استفاده شد. متغیرهای مستقل در این بررسی شامل اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بود. متغیر وابسته وزن اسید گلیسیریزیک استخراج شده و میزان عصاره کلی به ازاء صد گرم ریشه شیرین بیان بود. از روش طراحی تجربی فاکتوریل کامل برای طراحی آزمایش‌ها استفاده شد. تعداد 9 آزمایش بر اساس روش طراحی فاکتوریل کامل انجام شد. بررسی آماری و بهینه‌سازی شرایط فرایندی با روش سطح پاسخ با استفاده از نرم‌افزار Design Expert (version 7) انجام شد. اثر معنی‌داری متغیرها در سطح 5٪ در نظر گرفته شد.

جدول 2- مقادیر متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی آزمایشات و نتایج تجربی متغیرهای وابسته

Table 2- The values of independent variables used to design experiments and experimental results of dependent variables

شماره Number	اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) Diameter of licorice root (cm)	عصاره کلی (درصد وزنی) Total extract (wt%)	بازدهی اسید گلیسیریزیک (درصد وزنی) glycyrrhizic acid yield (wt%)
1	60	2.5	61.68	5.5
2	120	1.5	40.49	5.1
3	35	1.5	54.95	5.1
4	60	3.5	54.10	2.9
5	60	1.5	58.87	5.5
6	35	2.5	59.73	5.5
7	120	3.5	67.02	5.5
8	120	2.5	65.84	5.5
9	35	3.5	52.33	2.5

نتایج و بحث

بررسی آماری شرایط فرایندی با روش سطح پاسخ

جدول 2 مقادیر متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی آزمایشات و نتایج تجربی متغیرهای وابسته را نشان می دهد.

ارزیابی پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک

جدول 3 و 4 نتایج آنالیز واریانس را برای مدل کاهش یافته درجه دوم با آثار متقابل به‌ترتیب در مورد پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که اندازه ذره (A) و قطر ریشه شیرین بیان (B) تاثیر معنی‌داری بر عصاره کلی نداشت. در حالی که قطر ریشه شیرین بیان (B) تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک داشت، همچنین اندازه ذره (A) تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک نداشت. اثر متقابل متغیرهای عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک تاثیر معنی‌داری داشت. از میان جملات درجه دوم B^2 (قطر ریشه شیرین بیان) تاثیر معنی‌داری بر مدل‌ها داشت. ضریب تبیین R^2 مدل‌های درجه دوم عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک به‌ترتیب برابر با 0/8803 و 0/9088 بود که بیانگر اعتبار بالای مدل‌ها بود.

جدول 5 ضرایب جملات مدل را برای دو پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک در حالت واقعی و کددار نشان می‌دهد. چنانکه در جدول 5**جدول** مشاهده می‌گردد، ضریب جملات قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره در مدل پاسخ عصاره کلی (در حالت کددار) به‌ترتیب برابر با 4/2859 و 0/8058 است که نشان می‌دهد تاثیر قطر ریشه شیرین بیان بیشتر از تاثیر اندازه ذره بر پاسخ عصاره کلی است. این نتیجه با نتایج آنالیز واریانس (جدول 3) منطبق است. مقدار P برای دو پارامتر قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره به‌ترتیب برابر با 0/0581 و 0/6334 است که بیانگر تاثیر بیشتر قطر ریشه شیرین بیان است. همچنین مشاهده می‌شود که هر دو پارامتر تاثیر مثبتی بر پاسخ عصاره کلی دارند. به عبارت دیگر، مقدار پاسخ عصاره کلی با افزایش هر دو پارامتر قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره ، افزایش می‌یابد.

در مورد پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک نیز مشاهده می‌گردد که ضریب جملات قطر ریشه شیرین بیان و اندازه ذره (در حالت کددار) به‌ترتیب برابر با 0/6892- و 0/5036 است که نشان می‌دهد تاثیر قطر ریشه شیرین بیان کمی بیشتر از تاثیر اندازه ذره بر روی پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک است. این نتیجه‌گیری منطبق بر نتایج آنالیز واریانس (جدول 4) است. مقادیر P برای دو پارامتر قطر ریشه

شیرین بیان و اندازه ذره به‌ترتیب برابر با 0/0314 و 0/0687 برای پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک است که بیانگر تاثیر بیشتر قطر ریشه شیرین بیان است. همچنین مشاهده می‌شود که تاثیر قطر ریشه شیرین بیان بر روی پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک منفی است. به عبارت دیگر با افزایش قطر ریشه شیرین بیان، مقدار پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک کاهش می‌یابد. ولی تاثیر اندازه ذره بر روی پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک مثبت است. به عبارت دیگر با افزایش اندازه ذره ، مقدار بازدهی اسید گلیسیریزیک افزایش می‌یابد.

جدول 3- نتایج آنالیز واریانس برای مدل کاهش یافته درجه دوم با آثار متقابل در مورد پاسخ عصاره کلی

Table 3– The analysis of variance for the reduced quadratic model with interactions on the total extract response

منبع تغییرات Source	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	مقدار F F-value	مقدار P P-value
مدل Model	455.82	4	113.96	7.35	0.0395
اندازه ذره (مش) A-Particle size (mesh)	4.12	1	4.12	0.27	0.6334
قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) B-diameter of licorice root (cm)	107.34	1	107.34	6.93	0.0581
AB	269.24	1	269.24	17.38	0.0140
B^2	121.39	1	121.39	7.83	0.0489
باقیمانده Residual	61.98	4	15.49		
مجموع مربعات کل Sum of Squares	517.80	8			
انحراف استاندارد Standard Deviation	3.94				
ضریب تغییرات C.V. %	6.88				
مجموع مربع‌های خطای پیش‌بینی شده PRESS	545.61				
R^2	0.8803				
میانگین Mean	57.2235				
دقت کافی Adeq Precision	8.3628				

جدول 4- نتایج آنالیز واریانس برای مدل کاهش یافته درجه دوم با آثار متقابل در مورد پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Table 4- The analysis of variance for reduced quadratic model with interactions on glycyrrhizic acid yield response

منبع تغییرات Source	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	مقدار F F-value	مقدار P P-value
مدل Model	10.48	4	2.62	9.96	0.0234
اندازه ذره (مش) A-Particle size (mesh)	1.61	1	1.61	6.11	0.0687
قطر ریشه شیرین بیان (سانتی متر) B-diameter of licorice root (cm)	2.78	1	2.78	10.56	0.0314
AB	2.75	1	2.75	10.48	0.0318
B^2	2.28	1	2.28	8.66	0.0423
باقیمانده Residual	1.05	4	0.26		
مجموع مربعات کل Sum of Squares	11.53	8			
انحراف استاندارد Standard Deviation	0.51				
ضریب تغییرات C.V. %	10.71				
مجموع مربع‌های خطای پیش‌بینی شده PRESS	11.35				
R^2	0.9088				
میانگین Mean	4.7889				
دقت کافی Adeq Precision	9.3426				

در التراسونیک فروپاشی حباب‌ها شکست دیواره‌های سلولی را تسهیل نموده و نفوذ حلال به مواد خام بهتر صورت می‌گیرد. بنابراین سطح تماس ذرات جامد افزایش یافته و انتقال جرم از میان غشاء سلولی افزایش می‌یابد. روش‌های متداول استخراج اسید گلیسیریزیک از شیرین بیان دارای معایبی مانند زمان استخراج زیاد، درجه حرارت استخراج بالاتر و بازدهی کمتر است (Liao et al., 2016). Charpe و Rathod (2012) استخراج اسید گلیسیریزیک را از ریشه شیرین بیان با روش التراسونیک و روش‌های متداول مقایسه کردند. نتایج نشان داد که در روش التراسونیک 37/3 mg/g اسیدگلیسیریزیک در 10 دقیقه، با سیستم استخراج‌کننده همزن‌دار 28/77 mg/g اسید گلیسیریزیک در 10 دقیقه و در روش سوکسله 37/63 mg/g اسیدگلیسیریزیک در 5 ساعت به‌دست آمد. Charpe و Rathod (2014) نیز گزارش کردند که با روش التراسونیک در 20 دقیقه 95/69 درصد و با روش متداول در 60 دقیقه، 68 درصد اسید گلیسیریزیک موجود در شیرین بیان استخراج شد. نتایج Ahmadian و همکاران (2018) نشان داد که در روش التراسونیک غلظت گلیسیریزین در محلول حاصل 10/485 و در روش متداول 0/6682 میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود.

جدول 5- مفادیر ضرایب جملات مدل برای دو پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک در حالت واقعی و کددار

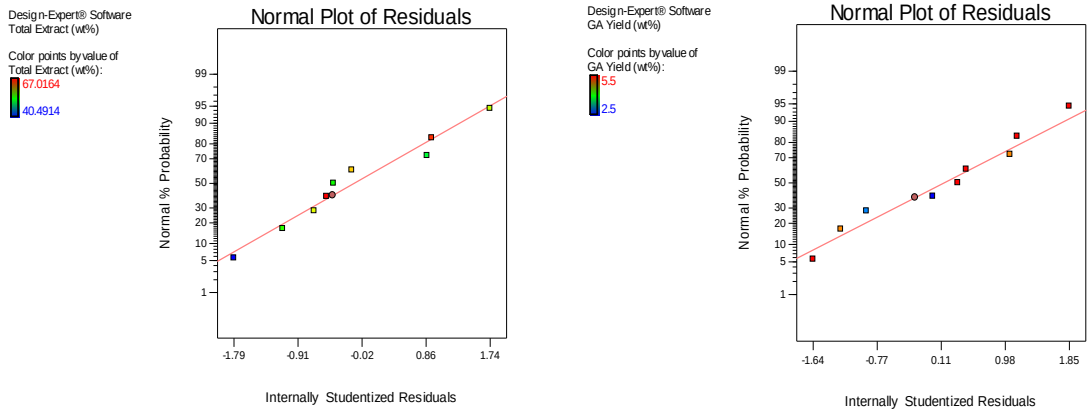
Table 5– The models coefficients for total extract and glycyrrhizic acid yield responses in real and coded state

	عصاره کلی (درصد وزنی) Total extract (wt%)		بازدهی اسید گلیسیریزیک (درصد وزنی) (wt%) glycyrrhizic acid yield	
	Coded کددار	Real واقعی	Coded کددار	Real واقعی
	62.5279	38.0392	5.5691	3.3876
* اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	0.8058	-0.4506	0.5036	-0.0356
* قطر ریشه شیرین بیان (سانتی متر) Diameter of licorice root (cm)	4.2859	28.6847	-0.6892	3.1720
* اندازه ذره (مش)* قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) Particle size (mesh) *Diameter of licorice root (cm)	7.9819	0.1878	0.8073	0.0190
قطر ریشه شیرین بیان^2 diameter of licorice root^2 (cm^2)	-7.7908	-7.7908	-1.0667	-1.0667

نمودارهای ارزیابی مدل

شکل 2 نمودار نرمال باقیمانده‌ها را برای پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. چنانکه مشاهده می‌شود نقاط بر روی خط راست قرار دارند و از توزیع نرمال تبعیت می‌کنند.

شکل3 نمودار باقیمانده‌ها برحسب مقادیر پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. چنانکه مشاهده می‌شود نقاط در بین دو خط قرار دارند و بنابراین مدل به‌خوبی داده‌های تجربی را برازش می‌کند.

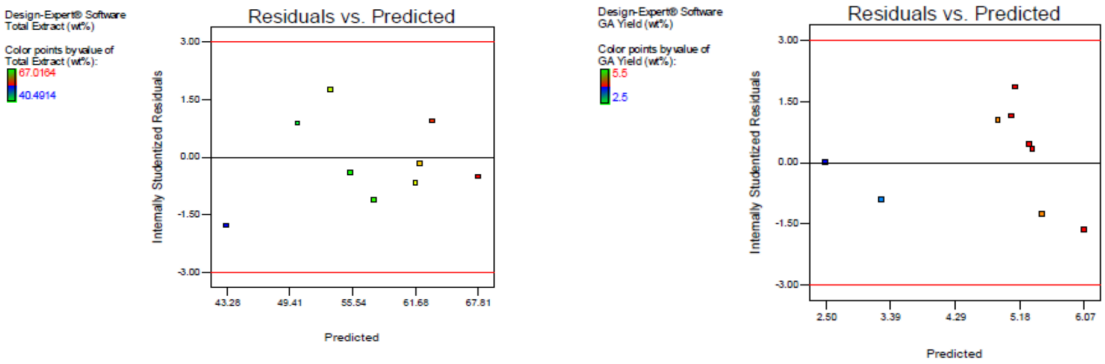


(a) (الف) (b) (ب)

شکل 2- نمودار نرمال باقیمانده‌ها (الف) پاسخ عصاره کلی (ب) پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Fig. 2. Normal plot of residuals (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response

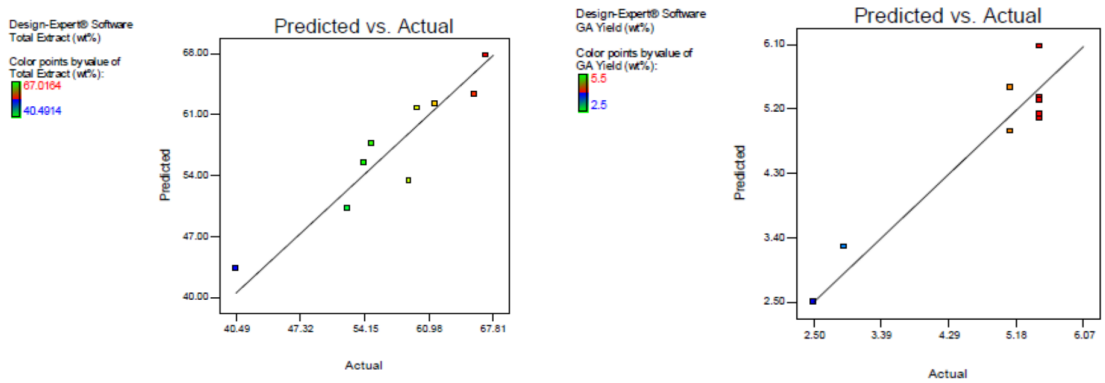
شکل 4 مقادیر داده‌های تجربی را بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده به‌وسیله مدل نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که نقاط بر روی یک خط قرار دارند، بیانگر آن است که مدل به‌خوبی داده‌های تجربی را برازش می‌کند. شکل 5 نمودار Box-Cox را برای تبدیل توانی در مورد پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. این نمودار مناسب‌ترین تبدیل توانی را برای داده‌های پاسخ تعیین می‌کند. 95٪ فاصله اطمینان حول بهترین مقدار lambda (نقطه مینیمم منحنی) شامل عدد یک است، بنابراین مدل‌ها مناسب است و هیچ تبدیل ویژه‌ای برای مدل پاسخ عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک پیشنهاد نمی‌شود.



(a) (الف) (b) (ب)

شکل 3- نمودار باقیمانده‌ها بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده (الف) پاسخ عصاره کلی (ب) پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Fig. 3. The residuals against the predicted (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response



(a) (الف) (b) (ب)

شکل 4- مقادیر داده‌های تجربی بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده به وسیله مدل (الف) پاسخ عصاره کلی (ب) پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

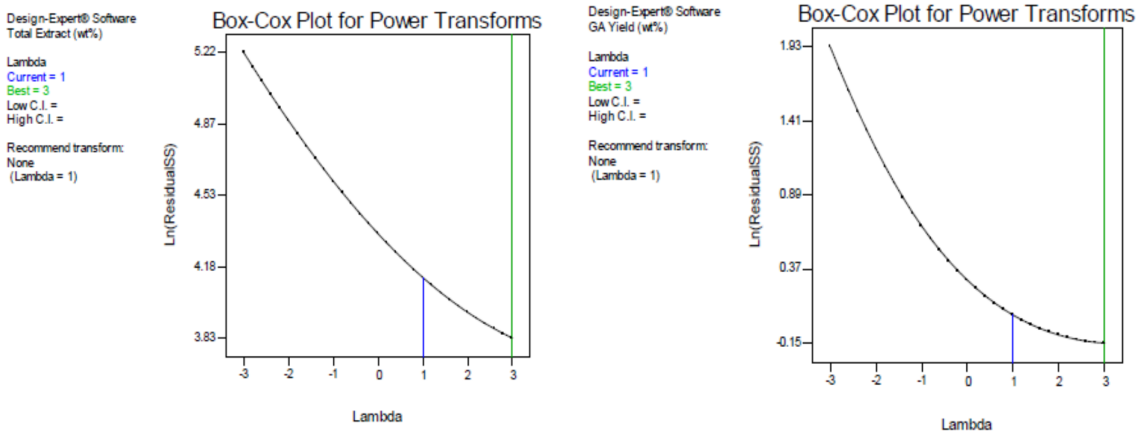
Fig. 4. The predicted against the actual values (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response

نمودارهای یک فاکتوری

شکل 7 تغییرات عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک را بر حسب قطر ریشه شیرین بیان نشان می‌دهد. اندازه ذره در مقدار ثابت (60mesh) در نظر گرفته شده است. چنانکه مشاهده می‌شود افزایش قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی‌داری بر پاسخ عصاره کلی نداشت. همچنین مشاهده می‌شود که افزایش قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک داشت. این نتیجه‌گیری از نتایج آنالیز واریانس (جدول 4) نیز مشاهده می‌گردد. مقدار P برای این پارامتر برابر با 0/0314 است که بیانگر معنی‌دار بودن تاثیر این پارامتر است. نتایج نشان می‌دهدکه با افزایش قطر ریشه شیرین بیان، مقدار بازدهی اسید گلیسیریزیک کاهش یافته است که منطبق با ضرایب جملات مدل است. چنانکه در جدول 5 مشاهده می‌گردد ضریب جمله قطر ریشه شیرین بیان در حالت کددار برای بازدهی اسید گلیسیریزیک برابر با 0/6892- است.

مطالعات نشان داد که ریشه‌های دارای قطر کمتر به این علت مقدار اسید گلیسیریزیک بیشتری دارند که سطح جانبی آنها به ازاء هر واحد وزن خشک بیشتر است. بنابراین در مقایسه با ریشه‌های ضخیم‌تر جذب عناصر غذایی از خاک بهتر صورت می‌گیرد (Bolouri

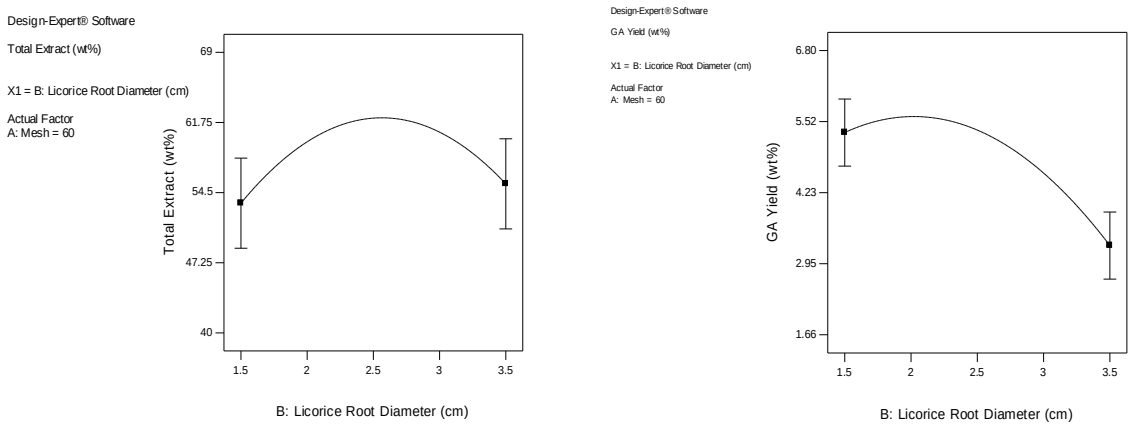
(Moghaddam et al., 2009). همچنین باید توجه داشت که اسید گلیسیریزیک در بافت‌های ریشه در درون پارانشیم پوستی تولید می‌شود. پارانشیم‌ها از بافت‌های مهم گیاهان به ویژه در گیاهان جوان محسوب می‌گردند. در ریشه‌های با قطر بیشتر در اثر فعالیت لایه زاینده، پوست از بین رفته و یک بافت چوب پنبه‌ای جایگزین آن می‌گردد که فاقد مواد موثره است (Bolouri Moghaddam et al., 2009). Douglas و همکاران (2004) نیز گزارش کردند که ریشه‌های با قطر کوچکتر، سطح تماس بزرگتری برای جذب مواد مغذی دارند که می‌تواند منجر به تجمع اجزاء فعال در آنها گردد. آنها نتیجه گرفتند که مقدار اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های شیرین بیان با قطر کوچکتر بیشتر است. Bolouri Moghaddam و همکاران (2009) تاثیر استخراج گلیسیریزین با متانول را در سه قطر مختلف (<1cm، 1- 2، 2<) ریشه شیرین بیان بررسی کرده و نشان دادند که کمترین قطر ریشه‌ها، بیشترین میزان گلیسیریزین را داشت (1/187 درصد). تاثیر قطر ریشه و شرایط اکولوژی بر مقدار اسید گلیسیریزیک در دو نوع ریشه شیرین بیان نشان داد که مقدار اسید گلیسیریزیک با قطر ریشه شیرین بیان تغییر می‌کند. مقادیر متوسط اسید گلیسیریزیک در محدوده 3/40- 1/36 درصد بود (Ahmadi Hosseini et al., 2014). Usai و همکاران (1995) نیز در یک پژوهش، استخراج گلیسیریزین از شیرین بیان را در ریشه‌های با قطر 0/2 ، 0/6- 0/55 ، 1/7 سانتی‌متر به‌ترتیب 0/93، 1/30 و 2/24 درصد به‌دست آوردند.



(a)(الف) (b) (ب)

شکل 5– نمودار Box-Cox برای تبدیل توانی (الف) پاسخ عصاره کلی (ب) پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Fig. 5. Box-Cox plot for power transforms (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response



(a) (الف) (b) (ب)

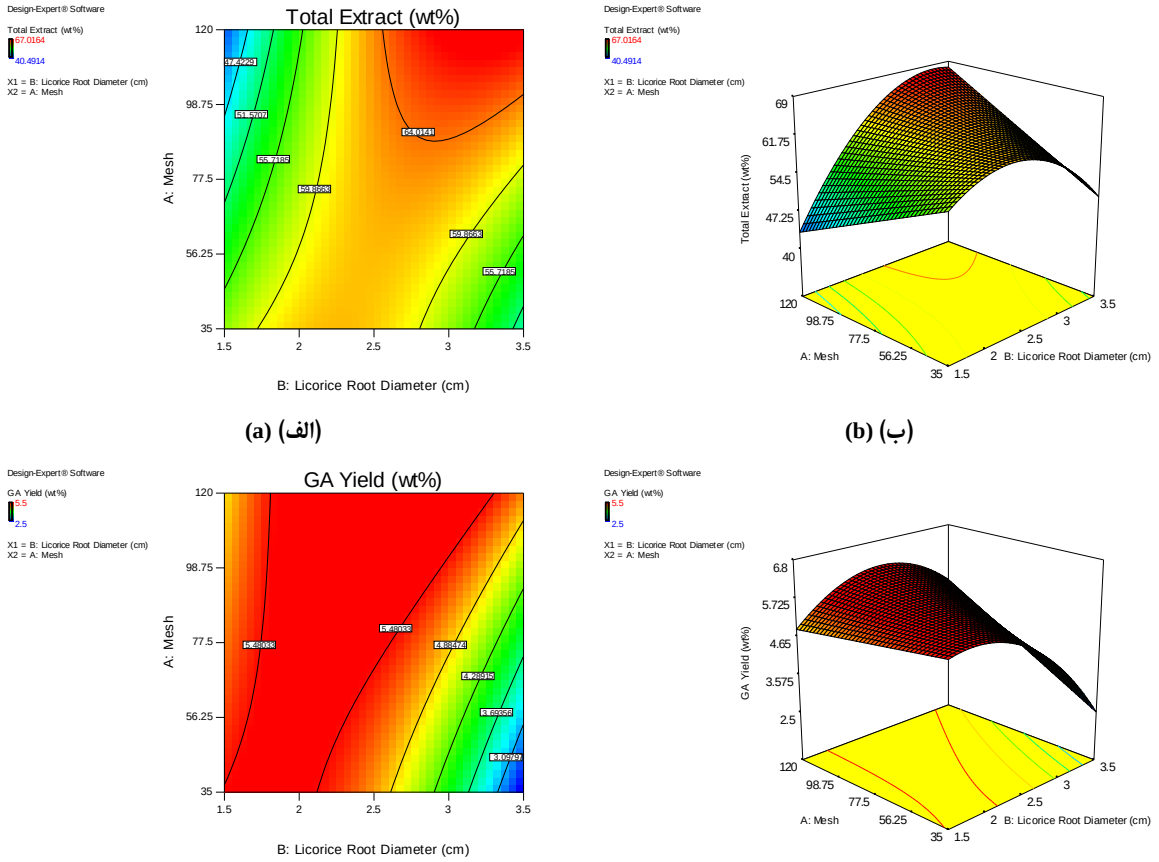
شکل 6– اثر پارامتر قطر ریشه شیرین بیان بر روی پاسخ‌ها (الف) عصاره کلی (ب) بازدهی اسید گلیسیریزیک

Fig. 6. The effect of licorice root diameter (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response

نمودار دو فاکتوری کانتور و سطح پاسخ

شکل 6 نمودارهای دو بعدی کانتور و سه‌بعدی سطح پاسخ تاثیر همزمان دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان را روی پاسخ-های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. چنانکه در شکل 7 (الف و ب) مشاهده می‌شود در مورد پاسخ عصاره کلی، دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان دارای اثر متقابل هستند. به عبارت دیگر، در مقادیر قطرهای کم ریشه شیرین بیان (1/5 cm)، با کاهش اندازه ذره (افزایش مش)، میزان پاسخ عصاره کلی کاهش می‌یابد. ولی در مقادیر زیاد قطر ریشه شیرین بیان (3/5 cm)، با کاهش اندازه ذره (افزایش مش)، میزان پاسخ عصاره کلی افزایش می‌یابد. بیشترین میزان استخراج عصاره کلی مربوط به حداکثر قطر ریشه شیرین بیان (3/5 cm) و حداقل اندازه ذره (120 mesh) است و برابر با 67/0164 درصد وزنی می‌باشد.

در مورد پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک نیز در شکل 7 (ج و د) مشاهده می‌شود که دو پارامتر دارای اثر متقابل هستند. به عبارت دیگر در مقادیر کم قطر ریشه شیرین‌بیان (1/5 cm)، با کاهش اندازه ذره (افزایش مش) تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک مشاهده نمی‌گردد. ولی در مقادیر زیاد قطر ریشه شیرین‌بیان (3/5 cm)، با کاهش اندازه ذره (افزایش مش)، میزان پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک افزایش معنی‌داری می‌یابد. بیشترین میزان استخراج اسید گلیسیریزیک مربوط به مقادیر کم قطر ریشه شیرین‌بیان و برابر با 5/5 درصد وزنی است.



(a) (الف)

(b) (ب)

(c) (ج)

(d) (د)

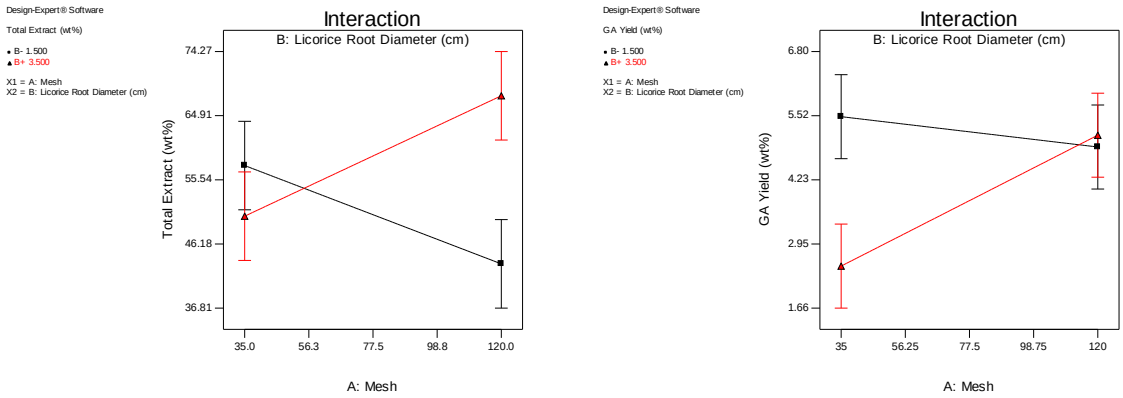
شکل 7– نمودارهای دو بعدی کانتور و سه بعدی سطح پاسخ تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان روی پاسخ‌های پیش بینی شده (الف) کانتور پاسخ عصاره کلی (ب) سطح پاسخ عصاره کلی (ج) کانتور پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک (د) سطح پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Fig. 7. 2D contours and 3D response surface effects of particle size and diameter of licorice root on the predicted responses (a) Contours of total extract response (b) Response surface of total extract response (c) Contours of Glycyrrhizic acid yield response (d) Response surface of Glycyrrhizic acid yield response

باید توجه داشت که اندازه ذره روی سرعت استخراج موثر است. ذرات کوچکتر دارای مساحت سطح ویژه بزرگتر و مسیر نفوذ درون ذره کمتری هستند که منجر به تسهیل انتقال جرم می‌گردد. اما محدودیت‌های زیر مزایای استفاده از ذرات ریز را برای استخراج محدود می‌کند (Ming, 2007). 1)آسیاب کردن زیاد گیاه که منجر به ذرات ریز کوچکتر از 100 میکرومتر می‌شود می‌تواند سلول‌های گیاه را پاره کرده و باعث آزادسازی مقدار زیادی اجسام سلولی نامطلوب به داخل حلال گردد. این قسمت‌های نامطلوب شامل ترکیبات قابل حل در چربی، نشاسته و مواد کلوئیدی هستند. در نتیجه، وقتی قسمت‌های دارای مقادیر زیاد نشاسته مانند ریشه‌ها، خیلی آسیاب شده و استخراج در درجه حرارت بالا انجام گیرد، بازیابی قسمت‌های فعال و موثر گیاه به میزان زیادی کاهش می‌یابد. زیرا نشاسته‌های حل شده مانع انتقال جرم در سطح ذرات می‌گردد. 2)ذرات ریز تمایل به تشکیل بستر جامد فشرده دارند که حلال در آنها به سختی نفوذ می‌کند. بنابراین به کاربردن اندازه ذره مناسب اهمیت دارد.

نمودارهای اثر متقابل

شکل 8 تاثیر متقابل دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان را بر پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسیدگلیسیریزیک نشان می‌دهد. چنانکه در شکل 8 (الف) مشاهده می‌شود در مورد پاسخ عصاره کلی دو پارامتر دارای اثر متقابل هستند. در میزان اندازه ذره برابر با 120 mesh با افزایش قطر ریشه شیرین بیان میزان عصاره کلی افزایش می‌یابد. این نتیجه گیری منطبق بر نتایج آنالیز واریانس (جدول 3) است. مقدار P در مورد تاثیر متقابل دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان برای پاسخ عصاره کلی (جمله AB) برابر با 0/0140 است که بیانگر معنی‌دار بودن تاثیر این پارامتر است.



(a) (الف) (b) (ب)

شکل 8- تاثیر متقابل اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بر پاسخ‌های (الف) عصاره کلی و (ب) بازدهی اسیدگلیسیریزیک

Fig. 8. Interaction between particle size and licorice root diameter on the responses (a) Total extract response (b) Glycyrrhizic acid yield response

در شکل 8 (ب) مشاهده می‌گردد که در مورد پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک نیز دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان دارای اثر متقابل هستند. در مقدار اندازه ذره برابر با 35 mesh، افزایش قطر ریشه شیرین بیان منجر به کاهش قابل‌ملاحظه‌ای بر پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک می‌گردد، ولی در مقدار اندازه ذره برابر با 120 mesh تغییرات قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسیدگلیسیریزیک ندارد. این نتیجه گیری منطبق بر نتایج آنالیز واریانس (جدول 4) است. مقدار P در مورد تاثیر متقابل دو پارامتر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان برای پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک (جمله AB) برابر با 0/0318 است که بیانگر معنی‌دار بودن تاثیر این پارامتر است.

به‌طور کلی اندازه ذره یک نقش بحرانی در بسیاری از فرایندهای استخراج از گیاهان دارویی بازی می‌کند. با کاهش اندازه ذرات، سطح تماس افزایش می‌یابد و پدیده انتشار امواج التراسونیک به‌طور موثرتری رخ می‌دهد. در نتیجه بازده استخراج افزایش می‌یابد. اما وقتی اندازه ذرات نمونه بیش از حد کوچک شود به کاربردن امواج التراسونیک منجر به از هم گسیختگی شدید سلولی می‌گردد. بنابراین پدیده انتشار به‌خوبی صورت نمی‌پذیرد و در نتیجه افزایش قابل توجهی در بازده استخراج به‌دست نمی‌آید (Keyhani et al., 2016). علاوه بر این، ذرات خیلی کوچک در حلال استخراج شناور می‌شوند و تماس ذرات با حلال محدود می‌گردد (Yeop et al., 2017).

بهینه‌سازی

شرایط بهینه به منظور حداکثرسازی پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسیدگلیسیریزیک تعیین گردید. جدول 6 محدوده متغیرهای مستقل و وابسته را برای بهینه‌سازی پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. جدول 7 و 8 شرایط بهینه پیش‌بینی شده را برای پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهند. ستون مطلوبیت[1] در جدول 7 و 8 بیان‌کننده میزان قابل قبول بودن شرایط جهت بهینه‌سازی است. هر چه مقدار مطلوبیت به یک نزدیکتر باشد، پاسخ‌ها به معیار مشخص‌شده برای بهینه‌سازی نزدیک‌تر هستند. بر اساس نتایج جدول 7 شرایط بهینه برای حداکثر-سازی پاسخ عصاره کلی شامل اندازه ذره برابر با 120 mesh و قطر ریشه شیرین بیان برابر با 3/29 سانتی‌متر است. در این شرایط، پاسخ عصاره کلی برابر با 68/16 درصد وزنی است. بر اساس نتایج جدول 8 شرایط بهینه برای حداکثرسازی پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک شامل اندازه ذره برابر با 118/36 mesh و قطر ریشه شیرین بیان برابر با 2/72 سانتی‌متر است. در این شرایط، پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک برابر با 6/02 درصد وزنی است.

1 Desirability

جدول 6- محدوده متغیرهای مستقل و وابسته برای بهینه‌سازی پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک

Table 6- The range of independent and dependent variables for optimizing total extract and glycyrrhizic acid yield responses

متغیرVarible	هدفGoal	حد پایینLower Limit	حد بالاUpper Limit
اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	در محدوده in the range	35	120
قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) diameter of licorice root (cm)	در محدوده in the range	1.5	3.5
عصاره کلی (درصد وزنی) Total extract (wt%)	حداکثر سازی maximize	40	69
بازدهی اسید گلیسیریزیک (درصد وزنی) glycyrrhizic acid yield (wt%)	حداکثر سازی maximize	2.5	6

جدول 7- شرایط بهینه پیش بینی شده برای پاسخ عصاره کلی

Table 7– The predicted optimal conditions for total extract response

شماره Number	اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) diameter of licorice root (cm)	عصاره کلی (درصد وزنی) Total extract (wt%)	مطلوبیت Desirability
1	120	3.29	68.16	0.97
2	120	3.31	68.16	0.97
3	120	3.17	68.05	0.97
4	35	2.26	62.16	0.76

جدول 8- شرایط بهینه پیش‌بینی شده برای پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

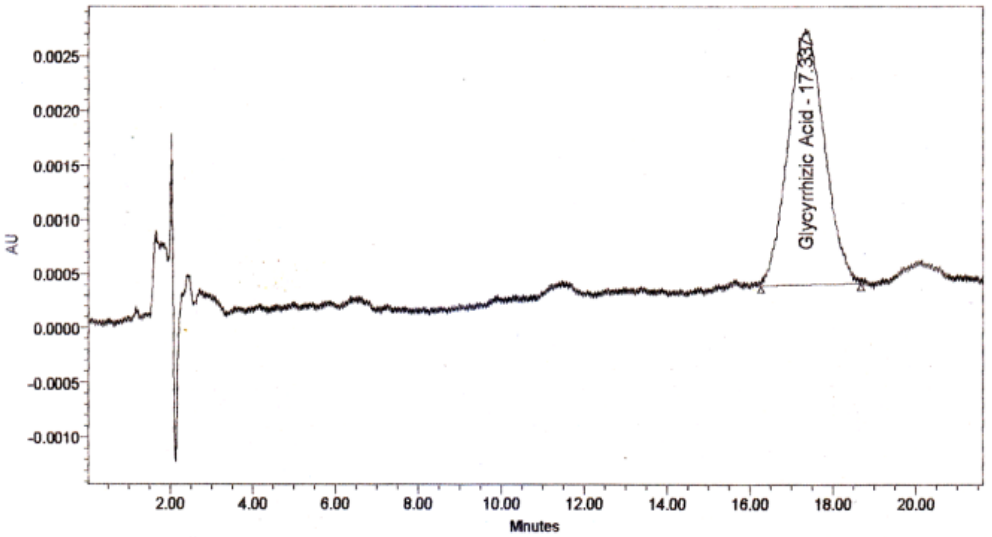
Table 8– The predicted optimal conditions for glycyrrhizic acid yield response

شماره Number	اندازه ذره (مش) Particle size (mesh)	قطر ریشه شیرین بیان (سانتی‌متر) diameter of licorice root (cm)	بازدهی اسید گلیسیریزیک (درصد وزنی) glycyrrhizic acid yield (wt%)	مطلوبیت Desirability
1	118.36	2.72	6.02	1
2	116.90	2.56	6.04	1
3	119.88	2.62	6.07	1
4	115.58	2.48	6.02	1
5	116.33	2.46	6.03	1

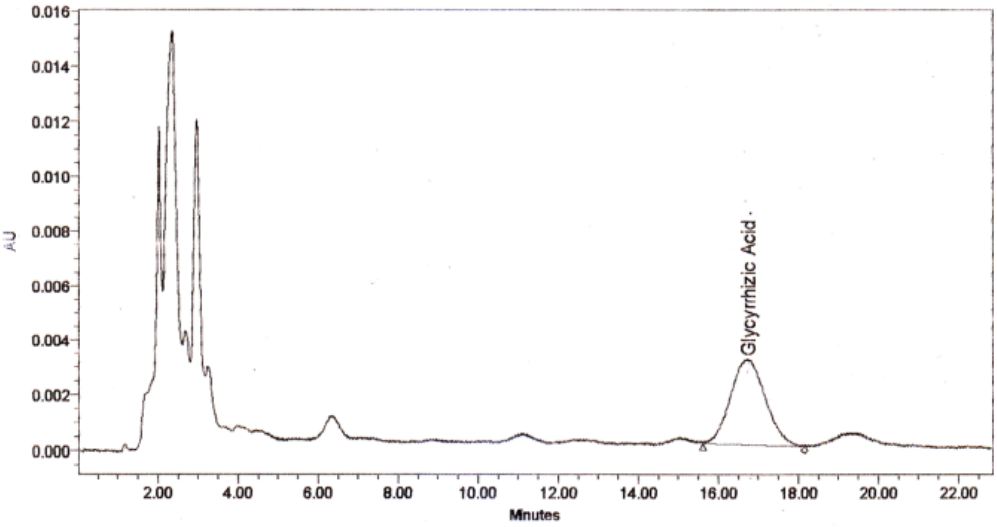
مطابق با British Pharmacopia حداقل مقدار استاندارد اسید گلیسیریزیک در شیرین بیان برابر با 4٪ است (Ahmadi Hosseini et al., 2014). Usai و همکاران (1995) مقدار اسید گلیسیریزیک را در ریشه شیرین بیان نمونه‌های ایتالیایی بین 2/24 -1/96 درصد گزارش کردند. Hennell و همکاران (2008) مقدار اسید گلیسیریزیک را در ریشه‌های شیرین بیان در مناطق جغرافیایی، شرایط آب و هوایی، گونه‌ها و فصل برداشت مختلف بین 2 تا 15 درصد وزنی گزارش کردند. Mareshige و همکاران (2011) مقدار گلیسیریزین 100 نمونه شیرین بیان را در محدوده زمانی 5 سال بررسی کردند. مقدار گلیسیریزین این گیاهان 0/46 تا 4/67 درصد گزارش گردید. Charpe و Rathod (2012) استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان را با روش التراسونیک بررسی کردند. حداکثر بازدهی اسید گلیسیریزیک برابر با 36/4 mg/g به‌دست آمد.

مقایسه استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان در حمام التراسونیک و پراب التراسونیک

میزان استخراج اسید گلیسیریزیک توسط پراب التراسونیک و حمام التراسونیک مشابه بوده و برابر با 5/5 درصد وزنی بود. این عدد از متوسط مقادیر اسید گلیسیریزیک استخراج شده در آزمایش‌های قبلی بیشتر است (شکل 10). می‌توان نتیجه گرفت که در استخراج توسط التراسونیک تفاوتی بین حمام و پراب نمی‌باشد. از طرفی توزیع اندازه ذرات تاثیر مثبتی بر استخراج دارد.



(الف)(a)



(ب)(b)

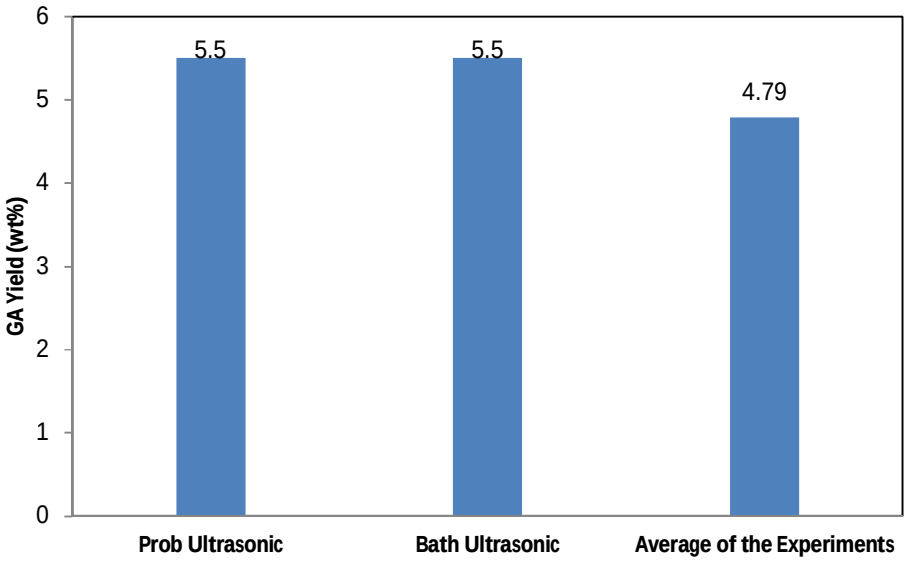
شکل 9- کروماتوگراف RP-HPLC برای (الف) نمونه استاندارد (ب) یک نمونه عصاره در این پژوهش

Fig. 9. RP-HPLC chromatograph for (a) standard sample (b) an extract sample in this study

نتایج نشان داد که در روش‌های متداول استخراج، توزیع اندازه ذره نفوذپذیری ذرات جامد را تحت تاثیر قرار می‌دهد. ذرات یکنواخت‌تر تخلخل منظم ایجاد می‌کند. در این حالت جریان یکنواخت حلال از میان ذرات جامد امکان استخراج یکسان را برای همه ذرات فراهم می‌کند. یک توزیع گسترده اندازه ذرات شامل ذرات با اندازه‌های مختلف و ذرات ریز و درشت است. در این حالت ذرات ریز درون منافذ خالی میان ذرات درشت‌تر را پر کرده و یک بستر جامد متراکم را تشکیل می‌دهد که حجم تهی و در نتیجه نفوذپذیری آن کمتر است.

در این صورت، کانال‌هایی در بستر جامد برای عبور حلال تشکیل شده و استخراج ناهمگن صورت می‌گیرد (Ming, 2007). در حالی که در سیستم التراسونیک مکانیسم استخراج متفاوت است. مکانیسم اصلی استخراج با التراسونیک، پدیده کاویتاسیون است. در پدیده کاویتاسیون در حلال حباب‌های ریزی تشکیل شده و تا اندازه بحرانی رشد می‌کنند. پس از آن انفجار صورت گرفته و منجر به آزادسازی مقدار زیادی انرژی می‌گردد. این انرژی به حلال منتقل می‌شود و منجر به ایجاد اغتشاشات شدیدی به‌صورت موضعی در حلال

می‌گردد. اغتشاشات ایجاد شده باعث افزایش انتقال جرم می‌شود (Keyhani et al., 2016). با به‌کار بردن امواج التراسونیک جهت استخراج مواد موثره از گیاهان دارویی، سرعت استخراج و بازده آن افزایش می‌یابد. بنابراین توزیع اندازه ذره منجر به استخراج بیشتر مواد موثره از گیاهان می‌گردد. چنانکه در شکل 10 نیز مشاهده می‌شود توزیع اندازه ذرات تاثیر مثبتی بر استخراج دارد و منجر به افزایش استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان می‌شود.



شکل 10- مقایسه استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان در حمام التراسونیک (با توزیع اندازه ذرات شیرین بیان) و پراب التراسونیک (با توزیع اندازه ذرات شیرین بیان)

Fig. 10. The comparison of glycyrrhizic acid extraction from licorice root using ultrasonic bath (with licorice particle size distribution) and ultrasonic probe (with licorice particle size distribution)

نتیجه‌گیری

استخراج با التراسونیک یک روش مطمئن برای استخراج مواد موثره از گیاهان است. مزایای اصلی این روش شامل کاهش زمان استخراج و درجه حرارت مورد نیاز و افزایش راندمان استخراج است. کاهش درجه حرارت منجر به اجتناب از آسیب حرارتی گیاه در طی فرایند استخراج می‌شود. در این پژوهش بررسی آماری استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان با استفاده از التراسونیک انجام گرفت. پارامترهای مورد بررسی شامل اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بود. طراحی آزمایش‌ها و مدلسازی پاسخ‌ها به‌ترتیب با استفاده از روش فاکتوریل کامل و روش سطح پاسخ صورت گرفت. متغیرهای وابسته شامل عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک بود. نتایج نشان داد که با کاهش قطر ریشه شیرین بیان، میزان استخراج افزایش یافت. در بهترین شرایط تجربی، 5/5 درصد وزنی استخراج اسید گلیسیریزیک صورت گرفت. همچنین راندمان به‌دست آمده با روش استخراج در حمام التراسونیک با پراب التراسونیک نتایج یکسانی را نشان داد. مقدار R^2 برای پاسخ‌های عصاره کلی و بازدهی اسید گلیسیریزیک به‌ترتیب برابر با 0/8803 و 0/9088 به‌دست آمد که بیانگر مناسب بودن مدل‌های پیشنهاد شده و برازش مدل بر اساس روش سطح پاسخ است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولین محترم سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران بواسطه حمایت مالی این پژوهش تشکر می‌گردد.

منابع

1. Ahmadi Hosseini, S. M., Souri, M.K., Farhadi, N., Moghaddam, M., Omidbaigi, R. (2014). Changes in *glycyrrhizin* content of Iranian *licorice* (*Glycyrrhiza glabra L.*) affected by different root diameter and ecological conditions. *Agrcultural Communications*, 2(4), 27-33.
2. Ahmadian, H., Mirahmadi, F., Rashidzadeh, B., (2018). Effects of ultrasound on extraction of *glycyrrhizin* from *Glycyrrhiza glabra L.* in comparison with modified Rosen's method. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 33(6), 961-974. (In Persian). DOI: 10.22092/IJMAPR.2018.108293.1885
3. Bolouri Moghaddam, E., Hemmati, Kh., Bashirisadr, Z., and Mashayekhi, K. (2009). Effect of harvest time and root diameter on *Glycyrrhizin* content in *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Plant Production*, 16(2), 29-45. (in Persian)
4. British Pharmacopoeia, (2009). Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, London.
5. Charpe, T.W., Rathod, V.K. (2012). Extraction of *glycyrrhizic acid* from *licorice* root using ultrasound: Process intensification studies. *Chemical Engineering and Processing*, 54, 37– 41. https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.002
6. Charpe, T.W., Rathod, V.K. (2014). Effect of ethanol concentration in ultrasound assisted extraction of *glycyrrhizic acid* from *licorice* root, *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 11(4), 21-30.
7. Douglas, J.A., Douglas, M. H., Lauren, D. R., Martin, R. J., Deo, B., Follett, J. M., Jensen, D. J. (2004). Effect of plant density and depth of harvest on the production and quality of *licorice* (*Glycyrrhiza glabra*) root harvested over 3 years, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32, 363-373. https://doi.org/10.1080/01140671.2004.9514317
8. Hemati, Kh., Hemati, N., Ghaedi, A., (2015). The effect of habtat, root diameter, and type of tissue on some secondary metabolites content of *licorice* (*glycerrhiza glabra*) in Khorasan Razavi (Ghoochan), *Journal of Plant Evvironmental Physiology*, 10(3) 1-10. (In Persian).
9. Hennell, J. R., Lee, S., Khoo, C. S., Gray, M. J., Bensoussan, A. (2008). The determination of *glycyrrhizic acid* in Glycyrrhiza uralensis Fisch. ExDC. (Zhi Gan Cao) root and the dried aqueous extract by LC– DAD, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47, 494-500. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.01.037
10. Keyhani, V., Mortazavi, S.A., Karimi, M., Karazhiyan, H., Sheikholeslami, Z., (2016). Ultrasound-assisted extraction of saponins from *chubak* plant (*Acanthophyllum Glandulosum*) root based on their emulsification and foaming properties, *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 4(4), 325-342. (in Persian). DOI:10.22101/JRIFST.2016.01.30.444
11. Khanahmadi, M., Gaffarzadegan, R., Khalighi-Sigaroodi, F., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Hajiaghaee, R. (2018). Optimization of the *glycyrrhizic acid* extraction from *licorice* by response surface methodology, *Iranian Journal of Chemistry and Chemal Enineering*, 37 (1), 121-129 .
12. Liao, J., Qu, B., Zheng, N., (2016). Extraction of *glycyrrhizic acid* from *glycyrrhiza uralensis* using ultrasound and Its process extraction model, *Applied Sciences*, https://doi.org/10.3390/app6110319
13. Mareshige, K., Hayashi, S., Shibata, T., Yamamoto, Y., Sekizaki, H. (2011). Variation of *glycyrrhizin* and *liquiritin* contents within a population of 5-year-old *licorice* (Glycyrrhiza uralensis) plants cultivated under the same conditions, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34, 1334-1337. https://doi.org/10.1248/bpb.34.1334
14. Ming, O. S. (2007). Comparative study on optimization of continuous countercurrent extraction for *licorice* roots. (MSc thesis), Department of Pharmacy. National University of Singapore, Singapore.
15. Mukhopadhyay, M., Panja, P., (2008). A novel process for extraction of natural sweetener from *licorice* (*Glycyrrhiza glabra*) roots. *Separation and Purification Technology*, 63, 539–545. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.06.013
16. Noori, W. O., Waisi, B.I, Alhassani, M.H. (2018). Extraction of *glycyrrhizin* from *licorice* (*Glycyrrhiza Glabra L.*) by bulk liquid membrane. *Environmental Technology & Innovation* 12, 180–188. https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.08.010
17. Pan, X., Liu, H., Jia, G., and Shu, Y. Y. (2000). Microwave-assisted extraction of *glycyrrhizic acid* from *licorice* root. *Biochemical Engineering Journal*, 5, 173–177. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00057-7
18. Shabkhiz, M.A., Eikani, M.H., Golmohammad, F., Bashiri Sadr, Z., (2015). Optimized Pressurized hot water extraction of *glycyrrhizic acid* from *Licorice* roots, *Innovative Food Technologies*, 2(4), 11-21. (In Persian). DOI:10.22104/JIFT.2015.200
19. Usai, M., Vincenzo, P., Domenico, A. (1995). *Glycyrrhizin* variability in subterranean organs of Sardinian Glycyrrhiza glabra subspecies glabra var. glabra. *Journal of Natural Products*, 58, 1727-1729. https://doi.org/10.1021/np50125a013
20. Yeop, A., Sandanasamy, J., Pang, S. F., Abdullah, S., Yusoff, M.M., Gimbun, J. (2017).The effect of particle size and solvent type on the *gallic acid* yield obtained from Labisia pumila by ultrasonic extraction, *MATEC Web of Conferences 111, 02008 (2017) FluidsChE 2017*, https://doi.org/10.1051/matecconf/201711102008.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 195- 202

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۰۲-۱۹۵

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Effect of replacing wheat flour with mung bean flour on the texture, physicochemical and sensory properties

Fariba Ataei Nukabadi[1*], Narges Nehchiri[1], Javad Keramat[2], Manuchehr Momeni Shahraki[3]

Received: 2015.04.05
Accepted: 2022.05.15

How to cite this article:
Ataei Nukabadi, F., Nehchiri, N., Keramat, J., Momeni Shahraki, M. (2022). Effect of replacing wheat flour with mung bean flour on the texture, physicochemical and sensory properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 195-202.

Abstract

Introduction: Increasing demand for various quality food products with health-related properties has caused many efforts to be made in producing such products. Cereal industry is among major industries with the potential of attracting people's attention in this regard. However, staling and lack of fiber and other nutritients in flour is a problem with the products of this industry. Mung bean belongs to Fabaceae family. Mung bean has 7.91% water content, 24.08% protein content, 1.55% fat content, 2.87% ash content, 2.20% fiber content, and 25.73% starch content. In addition, Mung bean has bioactive compounds like tannin, phytic acid, flavonoid, phenolic acid, and other organic acids. This bean is cultivated in Asia, Australia, New Zealand, and Africa.

Materials and Methods: In this study, mung bean powder was used in the formulation of sponge cake. The ingredients used in the formula were flour, cake liquid oil, sugar, fresh eggs, dry milk powder, baking powder, whey protein, vanilla and water. Mung bean flour replacied wheat flour by 0, 25, 50, 75, 100% in the sponge cake formula. The traditional sponge cake formula in this study was adopted from the work of Ataei Nukabadi and Hojjatoleslamy (2017). Sugar and oil were mixed for 5 min; the eggs were then added and mixed on the speed 3 setting for 5 min. The sifted powder materials and mung powder were gradually added into the mixer on speed 3 setting for 5 min. For each cake, 58- 60 g of cake batter was poured into a cake pan (50 g) and baked at 250- 280˚C for 20 min in preheated oven. The cakes were allowed to cool for 1 hour and then the cooled cakes were packed in poly propylene bags at room temperature before performing physicochemical and sensory evaluation. Chemical evaluation including moisture content, crude protein, ash, crud fat, density, wet gluten, were measured on the sponge cakes according to their standards. Texture profile analysis (TPA) of the cake samples from the midsection of the cakes was carried out using a texture analyzer on the first and thirtieth day of storage and Hardness, cohesiveness, cut, punch and springeness were also measured. Hunter Lab and a*, b*, L*, ΔE was used for color measurements of samples. The hedonic scale is a unique scale providing both reliable and valid results for sensory evaluation. A 5 point hedonic scale was applied to determine the degree of overall acceptance of the sponge cakes. Twenty semi- trained panelists received five samples and were asked to rate the samples based on degree of preference on a five- point hedonic scale (one: extremely dislike, two: dislike, three: neither like nor dislike, four: like, five: extremely like). The panelists received samples from the midsection of the cakes which had been held at room temperature. Each measurement was an average value of 3 replicates. The experimental data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) for a completely random design using a statistical analysis system. Duncan's multiple range test was used to determine the differences among means at significance level of 0.05.

1- Department of food science and technology, Islamic Azad University, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran.
2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
3- Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
(* Corresponding author Email: faribaataei129@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.39047.0

Result and Discussion: The results showed that hardness, punch, density, ash and protein increased as the level of mung bean powder increased, whereas springiness, moisture content, fat and gluten decreased. There was no significant difference between the samples in measuring the cohesiveness in the first and thirtieth day. Color measurements showed that crumb a* increased and b*, L*reverse trend was observed. The value of ΔE shown sponge cake contained 25% mung had the least difference with the control sample. In sensory evaluation, 25% sample was selected as an acceptable cake formula by the panelists, based on texture, taste, odor and color. The results shown, it is possible to produce sponge cake with different percentages of replacing wheat flour by mung bean powder. Increasing mung powder up to 50% does not have any significant effect on texture and organoleptic properties.

Key word: Mung flour, Sponge cakes, Hardness, Springiness, Cohesiveness

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 195- 202

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۰۲-۱۹۵

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی اثر جایگزینی آرد گندم با پودر ماش بر ویژگی‌های بافتی، فیزیکوشیمیایی وحسی کیک اسفنجی

فریبا عطایی نوکابادی[1*]- نرگس نهچیری[1]- جواد کرامت[2]- منوچهر مومنی شهرکی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵

چکیده

دراین مطالعه خمیر کیک اسفنجی به روش شکر- خمیر تهیه گردید و تاثیرجایگزینی آرد گندم در نسبت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و۱۰۰ درصد توسط آرد دانه ماش بر ویژگی‌های بافتی، فیزیکی، شیمیایی و حسی کیک اسفنجی طی دوره انبارمانی ۳۰ روزه در یک طرح کاملا تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سختی بافت در نمونه های ۷۵ و ۱۰۰ درصد افزایش وفنریت تنها در نمونه ۱۰۰ درصد طی دوره انبارداری کاهش یافت، این در حالی است که تفاوت معنی‌داری در پیوستگی بافت نمونه‌ها دیده نشد. نیروی لازم جهت سوراخ کردن و برش بافت نیز در درصدهای بالای جایگزینی افزایش یافت همچنین میزان چربی، گلوتن و رطوبت با افزایش میزان پودر ماش کاهش و میزان پروتئین، خاکستر، دانسیته نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p\leq0.05$). نتایج حاصل از آزمون رنگ نشان داد که قرمزی تیمارها نسبت به نمونه شاهد (صفر درصد) افزایش اما روشنایی و زردی با اختلاف معنی‌داری کاهش یافته است. با توجه به آزمون حسی انجام گرفته شده (هدونیک ۵ نقطه‌ای) ونتایج حاصل از آزمون بافت، می‌توان جایگزینی ۲۵ درصد آرد گندم با آرد ماش را به‌عنوان بهترین جایگزینی عنوان کرد..

واژه‌های کلیدی: آرد ماش، کیک اسفنجی، سختی، فنریت، پیوستگی.

مقدمه

صنعت غلات جزء بزرگترین صنایع در تمام جهان است که عمر نگهداری اغلب آن به‌طور میانگین چهار هفته است. غنی‌سازی و افزایش ماندگاری ،کیفیت و ارزش تغذیه‌ای محصولاتی چون کیک و بیسکوییت می‌تواند راهی در جهت ماندگاری در عرصه رقابت برای کارخانجات به‌شمار آید.

ماش (*Vigna radiate*) گیاهی یکساله از خانواده بقولات می باشد. دانه ماش از حبوبات با ارزش است که سرشار از فسفر است و از نظر مواد پروتئینی غنی بوده و حدود ۲۵ درصد پروتئین دارد. قابلیت هضم ماش از سایر حبوبات بیشتر است (Ahmadi et al., 2018). با توجه به ارزش تغذیه‌ای حبوبات به‌ویژه دانه ماش، در این مطالعه سعی شده است تا بتوان با به‌کارگیری آرد ماش در فراورده‌های غلات به‌ویژه در صنعت کیک و تعیین بهترین سطح جایگزینی، علاوه بر بالا بردن ارزش تغذیه‌ای فراورده، کیفیت نیز حفظ گردد و محصول از ویژگی‌های کیفی و ارگانولپتیکی مناسبی برخوردار باشد.

تاکنون تحقیقات زیادی جهت غنی‌سازی فراورده‌های غلات از جمله نان و کیک صورت گرفته است، در مطالعه‌ای به بررسی غنی سازی کیک بدون گلوتن با فیبر جو و صمغ‌های اینولین و گوار پرداخته شد و ویژگی‌های فیزیکی آن را مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که حجم مخصوص کیک غنی شده با فیبر و صمغ به طور معنی‌داری تغییر نمی‌کند، همچنین ویژگی‌های بافت کیک نیز تغییر قابل توجهی نخواهد کرد، علاوه بر آن کیک‌ها قابلیت هضم بالاتری دارند، همچنین افزودن فیبر باعث افزایش ویسکوزیته خمیر می شود (به استثنای اینولین) و در نهایت ترکیب فیبر با اینولین به عنوان بهترین نمونه جهت غنی‌سازی کیک بدون گلوتن معرفی شد (Gularte et al., 2012). در مطالعه‌ای دیگر غلظت‌های مختلف چای سبز جایگزین آرد کیک شد و مشاهده گردید که میزان فیبر، پروتئین و خاکستر تیمارها افزایش یافت درحالیکه میزان کربوهیدرات کاهش یافته و بافت نمونه‌ها سفت‌تر و سخت‌تر شده است (Lu et al., 2010). در مطالعه‌ای دیگر جانشینی آرد گندم با آرد نخود در کیک بررسی شده است و نتایج نشان داد که آرد نخود می‌تواند برکیفیت کیک اثرگذار باشد به نحوی که هرچه میزان آرد نخود افزایش یابد حجم، تقارن، روشنایی بافت و پوسته نمونه‌ها کاهش می

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: faribaataei129@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.39047.0

یابد. همچنین بافت سخت‌تر می‌گردد و از پیوستگی بافت نمونه‌ها کاسته می‌شود (Gomez et al., 2010).

مواد و روش‌ها

مواد اولیه خمیر کیک بر اساس ۱۰۰ گرم آرد شامل: آرد نول، روغن نباتی لادن (۵۲ گرم)، شکر سفید ۷۲ گرم (خریداری شده از کارخانه نقش جهان اصفهان)، تخم‌مرغ (۷۲ گرم)، بیکینگ پودر (۱/۳ گرم)، وانیل (۰/۵ گرم)، شیر خشک (۲ گرم)، پودر آب پنیر (۴ گرم)، آرد ماش، آب (۲۵ گرم). پس از تهیه نمونه شاهد، آرد ماش با درصدهای صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ جایگزین آرد گندم در کیک شد (براساس ۱۰۰ گرم آرد).

آماده‌سازی پودر دانه ماش

دانه‌های ماش (رقم گوهر) پس از شستشو و خشک شدن توسط آسیاب برقی خانگی (MJ-176 N، Matsushita Electric، ژاپن) آسیاب شد و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد و مطابق با فرمولاسیون تیمارها جایگزین مقادیر مختلف آرد کیک گردید.

آماده‌سازی خمیر کیک

خمیر تمامی نمونه‌ها مطابق با روش Ataei و همکاران (۲۰۱۷) تهیه گردید و در قالب‌های ۷۰ گرمی ریخته شد و در فر صنعتی قفسه ای با سرعت ۱ دور بر دقیقه با دمای ۱۹۰ تا۲۳۰ سانتی‌گراد به مدت ۱۳ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از پخت و سرد شدن در دمای محیط، کیک‌ها توسط دستگاه با پوشش سلوفان بسته‌بندی شدند و در دمای محیط به مدت سی روز انبارباني شدند.

اندازه‌گیری دانسیته

دانسیته کیک‌ها از تقسیم وزن به حجم کیک به‌دست آمد. حجم کیک‌های تهیه شده طبق استاندارد AACC 11TH (جابه‌جایی ریزدانه‌ها) اندازه‌گیری شد.

ارزیابی شیمیایی کیک

اندازه‌گیری رطوبت: میزان رطوبت کیک مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۰۵ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری خاکستر: میزان خاکستر کیک مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۴۹ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پروتئین: میزان پروتئین کیک مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۶۳ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری چربی: میزان چربی کیک مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۶۲ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان گلوتن مرطوب: میزان گلوتن کیک مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲-۹۶۳۹ اندازه‌گیری شد.

تست بافت

جهت ارزیابی بافت نمونه‌ها آزمون نیم رخ بافت (TPA) طی ۱ ماه انبارداری (روزهای اول و سی‌ام) انجام گرفت، در این تست از قطعات کیک (به ابعاد ۲۰ ×۲۵ ×۲۵ میلی‌متر) و دستگاه بافت‌سنج بروکفیلد (CT_3، Brook field engineering middleton) مجهز به پروب ۱۰۰۰/ ۲۵ TA با سرعت ۰/۵ mm/s و میزان حساسیت ۶/۸ گرم استفاده شد و پس از برداشتن پوسته از سطح کیک نیروی فشردگی به میزان ۵۰ درصد روی قطعات کیک طی دو سیکل رفت و برگشتی توسط دستگاه اعمال شد. همچنین جهت ارزیابی سختی بافت ،آزمون برش به‌وسیله پروب TA/53 انجام گرفت و نیروی برش به اندازه ۱۵ میلی‌متر پس از برداشتن پوسته از سطح کیک‌ها اعمال گردید. در آزمون پانچ (سوراخ کردن) از پروب TA/41 با سرعت ۰/۵ mm/s و میزان حساسیت ۶/۸ گرم استفاده شد و نمونه‌ها به اندازه ۱۰ میلی‌متر پانچ شدند (Ataei Nukabadi et al., 2020).

ارزیابی رنگ

ارزیابی رنگ بافت داخلی کیک‌ها توسط دستگاه هانتر لب (Colorflex ez، آمریکا) انجام گرفت و فاکتورهای روشنی (L*)، قرمزی (a*) زردی (b*) توسط دستگاه به‌دست آمد سپس از رابطه ذیل اختلاف رنگ ΔE اندازه‌گیری شد.

$$\Delta E=\sqrt{(L_0-L^*)^2+(a_0-a^*)^2+(b_0-b^*)^2} \quad (۱)$$

آزمون حسی

ارزیابی خواص حسی کیک‌ها با استفاده از آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای با حضور ۱۰ پنلیست آموزش دیده صورت گرفت. در این آزمون فاکتورهای بافت، طعم، پس طعم، رنگ، بو، پذیرش کلی به طور جداگانه در مورد نمونه‌ها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت، داده های به‌دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس و سپس آزمون دانکن درسطح اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت (Ataei Nukabadi et al., 2022).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این تحقیق به‌منظور مقایسه تاثیر درصدهای مختلف پودر دانه ماش بر ویژگی‌های اندازه‌گیری شده کیک‌ها از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، آنالیز واریانس یکطرفه و سپس آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد، به کمک نرم‌افزار spss ویرایش ۱۸ استفاده شد.

بحث و نتایج

ارزیابی دانسیته

نتایج حاصل از ارزیابی دانسیته در جدول ۱ نشان داده شده است. به‌طورکلی با افزایش میزان درصد ماش، دانسیته افزایش می‌یابد که این امر به ضعیف شدن ساختار کیک در نگهداری گاز دی‌اکسید کربن مرتبط است. نتایج به‌دست آمده مشابه با مطالعه افزودن آرد عدس به کیک بود (Hera et al., 2012).

ارزیابی آزمون‌های شیمیایی

با توجه به جدول ۱ مشاهده می‌شود که با افزایش میزان درصد ماش، رطوبت نمونه‌ها به‌ویژه در غلظت‌های بالا (۷۵ و ۱۰۰ درصد) با اختلاف معنی‌داری ($p\leq0.05$) کاهش یافته است همچنین کاهش رطوبت در طول دوره انبارداری (روز سی‌ام) به دلیل روند بیاتی طی انبارداری محصولات غلات و نانوایی نیز رخ می‌دهد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده با افزایش میزان درصد آرد ماش به کیک، میزان چربی نمونه‌ها کاهش می‌یابد، این در حالی است که در میزان پروتئین و مواد معدنی نمونه‌ها روند صعودی دیده می‌شود، علت این امر می‌تواند بالا بودن مقادیر مواد معدنی و پروتئین و پایین بودن میزان چربی در آرد ماش نسبت به آرد گندم باشد. همچنین در بررسی میزان گلوتن نمونه‌ها مشاهده گردید که با افزایش میزان درصد ماش، از میزان گلوتن نمونه‌ها کاسته شده است.

جدول ۱- بررسی اثر درصدهای مختلف جایگزینی آرد گندم با پودر ماش بر دانسیته، رطوبت، خاکستر، پروتئین و گلوتن مرطوب تیمارها

Table 1- Investigating the effect of different percentages of replacing flour with wheat powder on the density, moisture, ash, and gluten of treated plants.

	0	25	50	75	100
دانسیته Density	0.47± 0.03^{b}	0.50± 0.0^{b}	0.49 ±0.01^{b}	0.62 ±0^{a}	0.61 ±0^{a}
رطوبت روز اول Moisture of the first day	17.31± 0.15^{a}	11.61± 0.10^{d}	14.11 ±0.09^{b}	12.05 ±0.2^{a}	12.14 ±0.1^{c}
رطوبت روز سی‌ام Moisture on the thirtieth day	13.31± 0.7^{a}	12.14± 0.09^{b}	9.25 ±0.06^{c}	9.14 ±0.91^{c}	9.23 ±0.68^{c}
خاکستر Ash	1.03± 0.13^{c}	1.10± 0.12^{c}	1.51± 0.09^{b}	1.96 ±0.25^{a}	2.01 ±0.1^{a}
چربی Fat	18.92 ±0.4^{c}	18.7± 0.33^{c}	17.55 ±0.3^{b}	16.12 ±0.31^{a}	15.01 ±0.45^{d}
پروتئین Protein	9.12 ±0.7^{c}	9.08 ±0.45^{c}	9.24± 0.52^{c}	10.35 ±0.32^{b}	12.02 ±0.68^{a}
گلوتن(مرطوب) (Gluten (wet	10 ±0.1^{a}	7.23 ±0.2^{b}	4.61± 0.17^{c}	2.15 ±0.2^{d}	0 ^{d}

حروف یکسان در هر ردیف نشانگرعدم اختلاف معنی‌دار آماری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) بین نمونه‌ها است.

ارزیابی بافت تیمارها

نتایج ارزیابی بافت نمونه ها در جدول ۲ نشان داده شده است. فاکتور سختی تلفیقی از میزان مقاومت مغز و پوسته در اثر فشردگی است. هرچه دانسیته افزایش یابد استحکام و مقاومت کیک نیز بیشتر می‌شود و بنابراین میزان سختی نیز افزایش می‌یابد (Lu et al., 2010). در بررسی فاکتور سختی طی انبارداری (روز سی‌ام) تنها در غلظت‌های ۷۵ و۱۰۰ درصد جایگزینی، با افزایش دانسیته، سختی نمونه‌ها با تفاوت معنی‌داری افزایش یافته است، این در حالی است که تفاوت معنی‌دار در روز نخست بین نمونه‌ها مشاهده نمی‌شود. علاوه بر آن نیروی لازم جهت سوراخ کردن و برش کیک‌ها نیز افزایش می یابد که این افزایش در غلظت‌های بالا (۷۵ و ۱۰۰ درصد جایگزینی) به‌طور معنی‌داری خود را نشان داده است ($p\leq0.05$).

پیوستگی بافت، بستگی به مقاومت داخلی ساختار ماده غذایی دارد. بر طبق نتایج به‌ست آمده میزان پیوستگی نمونه‌ها با افزایش میزان درصد ماش تغییر معنی‌داری نداشته است که این روند در روز سی‌ام نیز به همین طریق بوده است. فنریت به توانایی بازگشت بافت به حالت اولیه پس از حذف نیرو گفته می‌شود. این فاکتور یک صفت مطلوب برای اغلب محصولات نانوایی محسوب شده که در طول زمان انبارداری کاهش می‌یابد. با افزایش میزان درصد ماش در فنریت نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود. تنها کاهش معنی‌دار مشاهده شده در میزان ۱۰۰ درصد جایگزینی ماش در طی انبارداری در روز

سی‌ام است. نتایج به‌دست آمده با نتایج حاصل از مطالعه افزودن چای سبز به کیک (Lu et al., 2010) و همچنین مطالعه بررسی کیک اسفنجی با آرد گندم و عدس مطابقت دارد (Hera et al., 2012).

ارزیابی رنگ

در سیستم رنگ CIELab، فاکتور*a بیان‌کننده قرمزی و سبزی است که میزان مثبت آن، تعیین‌کننده قرمزی و میزان منفی آن سبزی را تعیین می‌کند. فاکتور *b، زردی و آبی بودن را تعیین می‌کند، عدد مثبت آن، تعیین‌کننده رنگ زرد و عدد منفی آن بیان‌کننده رنگ آبی است. فاکتور *L، میزان روشنایی را تعیین می‌کند و مقدار آن از صفر تا ۱۰۰ متغیر است، صفر بیانگر سیاه مطلق و صد بیانگر سفید مطلق است. ΔE، اختلاف رنگ بین نمونه‌ها و شاهد را نشان می‌دهد و (Saricoban, and Yilmaz, 2010). در بافت داخلی کیک معمولا دما به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نمی‌رسد و تغییر رنگ مشاهده شده بیشتر تحت تاثیر فرمولاسیون و مواد تشکیل‌دهنده کیک (Hera et al., 2012). مطابق با جدول ۳ مشاهده می‌گردد که با افزایش میزان درصد جایگزینی آرد گندم با آرد ماش، فاکتور *a (قرمزی) نسبت به نمونه شاهد (۱۰۰ درصد آرد گندم) به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد این در حالی است که میزان زردی و روشنایی کیک‌ها به‌طور معنی دارکاهش یافته است ($p\leq0.05$)، که این امر به رنگدانه‌های تیره و کدر ماش نسبت به آرد مرتبط است. در مطالعه جانشینی آرد گندم با آرد نخود در کیک نیز مشاهده شد که افزودن آرد نخود باعث کاهش روشنایی و کدریت و تیره شدن بافت کیک می‌گردد (Gomez et al., 2011). نتایج ارزیابی حسی در جدول ۴ آمده است. طعم، بافت، رنگ و بو نمونه ۲۵ درصد جایگزینی آرد گندم با ماش مشابه با نمونه شاهد است. در پذیرش کلی نمونه‌ها بعد از نمونه شاهد بیشترین امتیاز مربوط به نمونه ۲۵ درصد جایگزینی است و بعد از آن به‌ترتیب نمونه‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد قرار گرفته‌اند.

جدول۲- بررسی اثر جایگزینی آرد گندم باپودر ماش بر خصوصیات بافتی کیک اسفنجی

Table 2- Investigating the effect of replacing wheat flour with mung bean powder on the textural characteristics of sponge cake.

ویژگی Properties	روز Day	0	25	50	75	100
سختی Hardness	1	138816 ±16.3 ^{a}	1201.25 ±27.3 ^{a}	989.16± 37.31 ^{a}	1311.52± 15.3 ^{a}	1957.75± 42.31^{a}
	30	2452.37 ±10.17^{b}	2216.01± 24.18^{b}	2114.21± 16.56^{b}	3420.14± 42.06^{a}	3610.01± 30.14^{a}
پیوستگی Continuity	1	0.45± 0.2^{a}	0.55± 0.01^{a}	0.59± 0.02^{a}	0.56± 0.03^{a}	0.53± 0^{a}
	30	0.36 ±0.2^{a}	0.36± 0.02^{a}	0.34± 0^{a}	0.33± 0.01^{a}	0.32± 0^{a}
فنریت Spring	1	14.96± 0^{a}	14.29± 0.09^{a}	14.23± 0.02^{a}	14.04± 0.02^{a}	13.79± 0.03^{a}
	30	12.46± 11^{a}	12.7± 0.03^{a}	12.5± 0.22^{a}	12.68± 0.12^{a}	11.69± 0.06^{b}
برش Cut	1	202.01± 50.51^{b}	213.83± 33.67^{b}	220.45± 20.4 ^{b}	263.5± 29.90 ^{b}	330.5± 28.60^{a}
	30	335.14 ±20.4 ^{b}	301.02 ±14.05 ^{b}	392.14 ±10.14^{a}	410.15 ±25.2 ^{a}	423.01± 26.5 ^{a}
پانچ Punch	1	188.02 ±23.49 ^{b}	193.83 ±13.69 ^{b}	311.83 ±39.66 ^{a}	339.02 ±20.84 ^{a}	370 ±40.0. ^{a}
	30	242.38± 12.60^{b}	230.19± 10.4^{b}	209.42± 10.53 ^{b}	425.01± 20.4 ^{a}	444.13± 22.2 ^{a}

حروف یکسان در هر ردیف نشانگرعدم اختلاف معنی‌دار آماری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) بین نمونه‌ها است.

جدول ۳- بررسی اثر جایگزینی آرد گندم باپودر ماش بر خصوصیات رنگ تیمارها

Table 3- Studying the effect of replacing wheat flour with mung bean powder on the color characteristics of the treatments.

	0	25	50	75	100
a	1.4± 0.16^{b}	2.33± 0.04^{a}	1.43± 0.07^{b}	2.33± 0.11^{a}	1.94± 0.19^{a}
b	24.08± 0.06^{a}	20.67± 0.03^{b}	18.51± 0.18^{c}	15.81± 0.17^{d}	14.75± 0.12^{e}
L	66.38± 0.48^{a}	51.29± 0.03^{b}	45.16± 0.40^{c}	37.19± 0.40^{d}	33.95± 0.35^{e}
ΔE	0 ^{e}	15.44± 0.04^{d}	21.88± 0.02^{c}	30.21± 0.1^{b}	34.50± 0.3^{a}

حروف یکسان در هر ردیف نشانگرعدم اختلاف معنی‌دار آماری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) بین نمونه‌ها است.**ارزیابی حسی**

جدول ٤- بررسی اثر جایگزینی آرد گندم باپودر ماش بر خصوصیات حسی تیمارها

Table 4- study of the effect of replacing wheat flour with mung bean powder on the sensory characteristics of the treatments

درصد جایگزینی	طعم	بافت	رنگ	بو	پذیرش کلی
0	4.9± 0.1[a]	4.9± 0.1[a]	4.9± 0.1[a]	4.9± 0.1[a]	4.9± 0.1[a]
25	4.2± 0.13[a]	3.9± 0.16[a]	4.8± 0.13[a]	4.7± 0.15[a]	4.4± 0.5[b]
50	3.4± 0.16[b]	3.1± 0.23[b]	3.1± 0.1[b]	3.4± 0.16[b]	3.3± 0.15[c]
75	2.6± 0.16[c]	2.5± 0.16[c]	2.5± 0.16[c]	3± 0.15[b]	2.4± 0.16[d]
100	1.5± 0.16[d]	1.3± 0.15[d]	1.4± 0.16[d]	1.7± 0.15[c]	1.2± 0.13[e]

حروف یکسان در هر ستون نشانگرعدم اختلاف معنی‌دار آماری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) بین نمونه‌ها است.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری

با توجه به ارزیابی‌های انجام شده تولید کیک اسفنجی تهیه شده با درصدهای مختلف جایگزینی آرد گندم با پودر ماش امکان‌پذیر است و این جایگزینی تفاوت قابل توجهی بر کاهش کیفیت بافتی کیک حداقل تا میزان ۵۰ درصد نخواهد گذاشت. با توجه به نتایج حاصل از آزمون حسی جایگزینی آرد گندم توسط ماش تا سطح ۲۵ درصد می‌تواند کاملا مطلوب باشد به‌طوریکه تفاوتی از نظر خواص حسی با نمونه شاهد ندارد، هرچند پیشنهاد می‌گردد که میزان ۵۰ درصد جایگزینی پودر ماش با به‌کارگیری طعم‌دهنده می‌تواند مطلوبیت مورد نظر را از نظر خواص بافتی و ارگانولپتیکی تامین نماید.

منابع

منابعمنابع

1. AACC 11TH. Approved Methods of Analysis .11th Edition
2. Ahmadi, A., Akbarpour, A. O., & Beiranvandi, M. (2018). Effect of seeding rates and weed management on growth, yield and yield components of Mungbean (*Vigna radiate* L.*). Iranian Journal of Pulses Research, 9(1), 152-164.* https://doi.org/10.22067/ijpr.v9i1.58059
3. Ataei, F., & Hojjatoleslamy, M. (2017) .Physicochemical and sensory characteristics of sponge cake made with olive leaf. *Journal of Food measurement and Characterization*, 11(4), 2259-2264. https://doi.org/10.1007/s11694-017-9610-6
4. Ataei Nukabadi, F., Hojjatoleslamy, M., & Abbasi, H. (2020). Optimization of fortified sponge cake by nettle leaves and milk thistle seed powder using mixture design approach. *Food science & Nutrition*, 9(2), 757-771. https://doi.org/ 10.1002/fsn3.2041
5. Ataei Nukabadi, F., Hojjatoleslamy, M., & Abbasi, H. (2022). Measurement of quercetin and 4-Hydroxyisoleucine in cakes fortified with nettle and fenugreek seed and study of their physicochemical properties using mixture design approach. *J Food Process Preserv, 46(5), 1-13.* https://doi.org/ 10.1111/jfpp.16527
6. Gomez, M., Maraleja, A., Oliete, B., Ruiz, E., & Caballero, P. A. (2010). Effect of fibre size on the quality of fibre-enriched layer cakes. *LWT- Food Science and Technology*, 43(1), 33-38. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.026
7. Gularte, M. A., dela Hera, E., Gomez, M., and Rosell, C. M. (2012). Effect of different fibers onbatter and gluten-free layer cake properties. *LWT-Food Science and Technology* 48 (2):209-214. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.015
8. Hafez, A. A. (2012). Physicochemical and sensory properties of cakes supplemented with different concentration of marjoram. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(13), 463-470.
9. Hera, E. D. L., París, E. R., Oliete, B., & Gómez, M. (2012). Studies of the quality of cakes made with wheat-lentil composite flours. *LWT- Food Science and Technology*, 49, 48-54. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.009
10. Iranian national standard (2553).cake properties and test approach.
11. Iranian national standard (2705). cerial products .moisture analysis method. Reference method.
12. Iranian national standard (2862). cerial products .fat content analysis method. Reference method.
13. Iranian national standard (2863). cerial products .protein analysis method. Reference method.
14. Iranian national standard (2705). cerial products .ash content analysis method. Reference method.
15. Iranian national standard (2705). cerial products .gluten analysis method. Reference method.
16. Kim, J. H., Lee, J. H., Lee, H. S., Lim, E. J., Imm, J. Y., & Suh, H. J. (2012). Physical and sensory characteristics of fibre-enriched sponge cakes made with Opuntia humifusa. *LWT- Food Science and Technology, 47*, 478-484. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.011
17. Lu, T. M., Lee, C. C., Mau, J. L., & Lin, S. D. (2010). Quality and antioxidant property of green tea sponge cake. *Food Chemistry, 119*, 1090-1095. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.015

18. Saricoban, C., & Yilmaz, M. T. (2010). Modelling the effects of processing factors on the changes in colour parameters of cooked meatballs using response surface methodology. *World Applied Sciences Journal*, *9*,14-22

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 203- 217

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۱۷-۲۰۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Investigation on the chemical composition, bioactive functional groups, antioxidant potential and cell toxicity (HT29) of Shirazi thyme essential oil: A study in laboratory scale

Elnaz Saffari Samani[1], Hossein Jooyandeh[2*], Behrooz Alizadeh Behbahani[3]

Received: 2020.09.29
Accepted: 2020.12.23

How to cite this article:
Saffari Samani, E., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B. (2022). Investigation on the chemical composition, bioactive functional groups, antioxidant potential and cell toxicity (HT29) of Shirazi thyme essential oil: A study in laboratory scale. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 203-217.

Abstract

Introduction: Shirazi thyme is a perennial herbaceous plant related to Lamiaceae family growing in central and southern regions of Iran. This study aimed to assess chemical composition, bioactive functional groups, antioxidant potential, total phenol, and total flavonoids of Shirazi thyme essential oil (STEO) and also to evaluate its cell toxicity effect against the colorectal cancer cell line (HT29).

Materials and Methods: The chemical composition of STEO was identified by gas chromatography-mass spectrometry. The bioactive functional groups of STEO were measured by Fourier transform infrared at spectra range of 500- 4000 cm^{-1}. The total phenol and total flavonoids of STEO were determined by folin- ciocalteu and aluminum chloride colorimetric method, respectively. MMT method was performed to measure the cell toxicity of STEO against the colorectal cancer cell line (HT29). The cells were cultured on DMEM high glucose medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin and incubated at 37°C with 95% relative humidity and 5% CO_2 concentration. The antioxidant activity of STEO was evaluated by DPPH and ABTS free radicals scavenging assays. Duncan test at 5% probability and SPSS software (version 18) was performed to compare the means of obtained results.

Results and Discussion: Based on GC/MS spectrometry, a total of 29 constituents were identified and quantified in the STEO representing more than 99% of total constituents. Thymol with 39.3% and Carvacrol with 30% were the most constituents of STEO. The other major compound of STEO were Benzene (8.52%), γ-Terpinene (5.27%), and Caryophyllene (2.97%). The presence of peak at a wavelength of 320- 1000 cm^{-1} demonstrates O-C bound that could be related to organic compounds such as alcohols, carboxylic acids, esters, and ethers. The peaks occurred at spectral range between 2800- 3000 cm^{-1} (particularly at 2869.6 up to 2960.8 cm^{-1}) are related to the stretching mode of C-H bounds and are mostly associated with alcoholic compounds in the essence. The amount of total phenol and flavonoids of STEO were 64.05 mg gallic acid equivalent/g and 11.68 mg quercetin equivalent/g, respectively. Results obtained from antioxidant activity of STEO with DPPH and ABTS free radicals scavenging showed that by increasing of STEO, the inhibition level of free radicals was enhanced. The inhibition percent of free radicals by using DPPH and ABTS at 1000 ppm concentration were 63.69% and 64.33%, respectively. The cell toxicity results of different STEO concentrations against the cell line HT29 revealed that survival of HT29 cells at 1, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 ppm of STEO were 100, 70.15,

1. MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding Author Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2020.40161.0

61.19, 59.33, 38.83, 25.68, 20.65 and 12.2%. According to the results of this study, as the concentration of STEO increased, its effect on the cell line HT29 enhanced and the cell percentage viability decreased. Some antioxidant activity of STEO could be interrelated to its phenolic compounds. Based on the results of antioxidant activity, the amount of total phenol and flavonoids and the effect of STEO on cell toxicity against the cell line HT29, it seems that the use of STEO is applicable in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: Shirazi thyme essential oil, Cell toxicity, Antioxidant activity, HT29 cell viability.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 203- 217

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۱۷-۲۰۳

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی ترکیبات شیمیایی، گروه‌های عاملی زیست‌فعال، قدرت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولی HT29: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی

الناز صفاری سامانی[۱]- حسین جوینده[۲]*- بهروز علیزاده بهبهانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳

چکیده

هدف از این پژوهش شناسایی ترکیبات شیمیایی، گروه‌های عاملی زیست‌فعال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل و فلاونوئید کل اسانس آویشن شیرازی و همچنین بررسی اثر سمیت سلولی آن بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) بود. ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی شد. گروه‌های عاملی زیست‌فعال اسانس آویشن شیرازی با استفاده از دستگاه FTIR در محدوده عدد موجی ۴۰۰۰-۵۰۰ cm^{-1} اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان فنل کل و فلاونوئید کل اسانس آویشن شیرازی به‌ترتیب از روش‌های فولین سیوکالتو و رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید استفاده گردید. از روش MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) جهت اندازه‌گیری سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی در برابر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) استفاده شد. قدرت آنتی‌کسیدانی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS بررسی گردید. ترکیب کارواکرول و تیمول به‌ترتیب با ۳۹/۳ و ۳۰ درصد بیشترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. وجود پیک در عدد موجی ۱۰۰۰-۳۲۰ cm^{-1} نشان‌دهنده پیوندهای O–C است که می‌تواند مربوط به ترکیبات آلی همچون الکل‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و اتر باشد. میزان فنل کل و فلاونوئید اسانس آویشن شیرازی به‌ترتیب ۶۴/۰۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و ۱۱/۶۸ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم بود. میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از DPPH و ABTS در غلظت ۱۰۰۰ ppm به‌ترتیب ۶۳/۶۹ و ۶۴/۳۳ بود. با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی، تأثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی آن کاهش یافت. با توجه به نتایج قدرت آنتی‌اکسیدانی، فنل و فلاونوئید کل اسانس آویشن شیرازی به نظر می رسد بتوان از گیاه آویشن شیرازی به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: اسانس آویشن شیرازی، سمیت سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، زنده‌مانی سلول‌های HT29.

مقدمه

آویشن شیرازی[۳] گیاه علفی چند ساله است که به خانواده نعناعیان تعلق دارد و در مناطق مرکزی و جنوبی ایران انتشار دارد (Amin et al., 2010). به‌صورت سنتی به‌عنوان ضدعفونی‌کننده، ضددرد و ضدنفخ مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ziaee et al., 2018) و دارای فعالیت ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Geraminezhad and Roostaei-Ali Mehr., 2018). ایمن و بی خطر بودن اسانس آویشن شیرازی توسط سازمان غذا و دارو آمریکا تصویب شده است (Dabbagh Moghaddam et al., 2019). این اسانس دارای ترکیبات فنلی (تیمول و کارواکرول) است که نقش رباینده‌های رادیکال آزاد را ایفا می‌کنند (Geraminezhad and Roostaei-Ali Mehr., 2018). ترکیبات فنلی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه گیاهی شناخته شده‌اند که از اتصال یک هسته آروماتیک و یک یا چند گروه هیدروکسیل تشکیل می‌شوند (Karaman et al., 2010). این ترکیبات به وفور در تمام قسمت‌های گیاهان توزیع شده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند (Mortazaei et al., 2016) که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را می‌توان به ویژگی‌های ردوکس و ساختار شیمیایی آن‌ها نسبت داد (Seyedalipour et al., 2016). از رایج‌ترین ترکیبات فنلی می‌توان به اسیدهای فنلیک، توکوفرول‌ها و فلاونوئیدها اشاره کرد (Huyut et al., 2017). فلاونوئیدها از معروف‌ترین گروه

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2020.40161.0
3 *Zataria multiflora* Boiss

های پلی‌فنل‌ها هستند و به گروه‌های فلاونول‌ها، فلاون‌ها، ایزوفلاون، فلاونون، فلاوانول و آنتوسیانیدین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. طیف گسترده‌ای از فعالیت بیولوژیکی را دارند و اغلب بیوفلاونوئید خوانده می‌شوند (Brodowska., 2017). به‌صورت بالقوه به‌عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند که در واقع فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به‌دلیل ماهیت پلی‌فنلی آن‌ها است (Symonowicz & Kolanek., 2012). مصارف دارویی آن‌ها سابقه طولانی دارد و به‌عنوان داروهای ضداسپاسم و ضدالتهاب در بازار عرضه می‌شوند (Brodowska., 2017).

رادیکال‌های آزاد اتم یا مولکول‌هایی هستند که به دلیل حضور الکترون‌های جفت نشده در لایه الکترونی بسیار واکنش‌پذیر هستند و بیماری‌زایی آن‌ها تأیید شده است (Mantashlo et al., 2017). واکنش های بیوشیمیایی مختلفی در بدن، گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر ایجاد می‌کنند (Fazli et al., 2013). گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر شامل آنیون‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن می‌باشند (Mantashlo et al., 2017). تنش اکسیداتیو ناشی از گونه-های اکسیژن واکنش‌پذیر منجر به آسیب DNA، اکسیداسیون پروتئین و پراکسیداسیون لیپیدها در بافت‌ها و سلول‌های زنده می‌شود که در ایجاد بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان، دیابت و پیری نقش اساسی دارد (Mortazaei et al., 2016) و از طرفی تغییرات اکسیداتیو در غذاهای چرب عامل اصلی ایجادکننده بو و طعم نامطلوب محسوب می‌شود و سبب کاهش ارزش غذایی آن‌ها می‌شود (Zangiabadi et al., 2012).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با مهار یا به تعویق انداختن اکسیداتیو حاصل از گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر، از سلول‌های بدن در برابر آثار زیان‌بار آن‌ها محافظت می‌کنند (Salhe Abadi and Mehraban Sang Atash., 2015). اگرچه در بدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی وجود دارد ولی باید بین رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تعادل برقرار باشد و اگر این تعادل بهم بخورد سبب ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (Mantashlo et al., 2017). امروزه از آنتی اکسیدان‌های سنتتیک نظیر BHT[1] و BHA[2] به‌عنوان نگهدارنده‌های شیمیایی در صنعت غذا استفاده می‌شود که مطالعات انجام شده بیانگر اثرات نامطلوب تغذیه‌ای و سرطان‌زایی آن‌ها است (Shahsavari et al., 2008). به همین دلیل استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مؤثر با سمیت کمتر می‌تواند جایگزین مناسبی باشد (Khoshsokhan et al., 2015) که ضمن بالا بردن مقاومت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما، سبب کاهش گرفتار شدن افراد به بیماری‌هایی مانند سرطان می‌شوند (Salhe Abadi and Mehraban Sang Atash., 2015).

سرطان بیماری پیچیده‌ای است که بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در جهان است (Khazraei-Moradian et al., 2014) و در اثر تکثیر غیرطبیعی سلول‌های بدن که تمایل به جدا شدن از منشاء اصلی و متاستاز دارند ایجاد می‌شود (Yonesi et al., 2017). سرطان روده بزرگ یا سرطان کولون به‌عنوان سومین سرطان شایع در زنان و مردان مطرح می‌باشد (Khazraei-Moradian et al., 2014) که فاکتورهای ژنتیکی، سبک زندگی و عادات غذایی از جمله فاکتورهای مرتبط با شیوع این بیماری می‌باشند (Sharififar et al., 2017) و اغلب به صورت توده‌های غیرسرطانی کوچک به نام پولیپ در روده شروع می‌شوند و به تدریج سرطانی می شوند (Dalali Isfahani et al., 2013). در پژوهش‌های اخیر نشان داده شده است که ترکیبات طبیعی مانند گیاهان دارویی از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌توانند نقش مهمی در پیشگیری و درمان سرطان داشته باشند. در واقع بهره‌گیری از گیاهان دارویی با هدف مهار فرایند تومورزایی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی یک راهکار نوین جهت مقابله با سرطان می‌باشد که از عوارض جانبی و هزینه کمتری برخوردار است. به همین دلیل انجام مطالعات علمی به‌منظور اثبات اثر بخشی داروهای گیاهی دارای اهمیت می‌باشد (Abdalan et al., 2018; Blowman et al., 2018).

پژوهش حاضر با هدف شناسایی ترکیبات و ساختار شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل تام، فلاونوئید تام و سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولی سرطان کولون روده (HT29) انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش رادیکال آزاد DPPH[3]، ABTS[4] و محیط کشت DMEM[5] از شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا، پرسولفات پتاسیم، معرف فولین سیوکالتو، متانول، DMSO[6] و سود از شرکت مرک آلمان، کربنات سدیم از شرکت سام چونگ کره، الکل ۹۶ درصد از شرکت زکریای جهرم و آلومینیوم تری کلراید از شرکت یونی چم تهیه شدند. تمامی مواد شیمیایی مصرفی در پژوهش حاضر دارای گرید آزمایشگاهی (خلوص بین ۹۷ تا ۹۹ درصد) بودند.

تهیه اسانس آویشن شیرازی

1 Butylated hydroxytoluene
2 Butylated hydroxyanisole
3 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
4(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
5 Dulbecco's modified eagle medium
6 Dimethyl sulfoxide

اسانس خالص آویشن شیرازی از شرکت جوهره طعم مشهد (مشهد، خراسان رضوی) خریداری شد. لازم به ذکر است که این شرکت جهت تهیه این اسانس از روش تقطیر با بخار استفاده نموده است.

آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies 7890 A، آمریکا) متصل به طیف‌سنج جرمی (Agilent Technologies 5975 C، آمریکا) استفاده شد. حجم ۱ میکرولیتر از اسانس آویشن شیرازی به دستگاه تزریق شد. این دستگاه حاوی ستون مؤیینه (Agilent Technologies Inc., HP-5 MS، آمریکا) با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر بود. تنظیمات دمایی این ستون به این صورت بود که از دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲/۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت. علاوه بر این، گاز هلیم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس به کمک طیف نرمال آلکان‌ها و محاسبه شاخص بازداری آن‌ها و ارجاع به کتابخانه ترکیبات طبیعی انجام شد (Alizadeh Behbahani et al., 2017).

آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

در این آزمون اسانس روغنی با پتاسیم برمید مخلوط و به دنبال آن با فشرده سازی به شکل قرص مناسب تغییر یافت. سپس طیف FTIR اسانس روغنی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر FTIR (Perkin Elmer، آمریکا) در محدوده عدد موجی ۵۰۰ cm^{-1} – ۴۰۰۰ با وضوح ۴cm^{-1} ثبت شد (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

تعیین محتوای فنل تام اسانس آویشن شیرازی

به‌منظور اندازه‌گیری میزان فنل تام اسانس آویشن شیرازی از روش فولین سیوکالتو استفاده گردید. در این روش ۱ میلی‌لیتر از اسانس آویشن شیرازی با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین که به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شده بود به خوبی مخلوط و به مدت ۲/۵ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷/۵٪) به محلول فوق اضافه و مخلوط گردید. در نهایت پس از ۱ ساعت نگهداری در تاریکی میزان جذب نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. با بهره‌گیری از منحنی استاندارد گالیک اسید میزان کل ترکیبات فنلی اسانس بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در واحد وزن اسانس گزارش شد (Mehrnia et al., 2019).

تعیین محتوای فلاونوئید تام اسانس آویشن شیرازی

جهت اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید تام اسانس آویشن شیرازی از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید استفاده شد. ابتدا ۱ میلی‌لیتر از اسانس با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه و ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم (۵٪) مخلوط گردید و به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. در مرحله بعد ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم تری کلراید (۱۰٪) افزوده گردید و بعد از ۵ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و تاریکی ۱ میلی‌لیتر سود ۱ مولار به آن اضافه شد و میزان جذب آن در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار فلاونوئید کل اسانس مطابق میلی‌گرم کوئرستین بر اکی‌والان اظهار گردید (Hossain and Marinova et al., 2005; Rahman., 2011).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی

تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

جهت برآورد قدرت آنتی‌رادیکالی اسانس با استفاده از مهار رادیکال آزد DPPH میزان ۱ میلی‌لیتر از اسانس با ۳ میلی‌لیتر از محلول DPPH متانولی ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط گردید و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط و تاریکی جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. متانول به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از معادله ۱ محاسبه و نتایج بر اساس IC50 گزارش شد (Brand-Williams et al., 1995; Jooyandeh and Haji Ebrahimi Forushani., 2019).

$$\text{درصد بازدارندگی رادیکال آزاد} = \left[\frac{\text{جذب نمونه اسانس} - \text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه شاهد}}\right] \times 100 \quad (۱)$$

تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

در این روش ابتدا محلول ۲/۴۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات با ۷ میلی‌مولار ABTS به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط شدند و محلول حاصل به‌منظور تولید رادیکال‌های کاتیونی ABTS مدت زمان ۱۶ ساعت در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. پس از آن محلول رادیکال ABTS تا جذب ۰/۷±۰/۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر با استفاده از متانول رقیق شد. سپس ۳/۹ میلی لیتر محلول ABTS رقیق شده با ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس مخلوط شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در دمای اتاق جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و در نهایت درصد بازدارندگی نمونه از طریق معادله ۲ محاسبه گردید (Barzegar et al., 2020).

$$\text{درصد مهارکنندگی رادیکال} = \left[\frac{\text{جذب نمونه اسانس} - \text{جذب نمونه کنترل}}{\text{جذب نمونه کنترل}}\right] \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

سمیت سلولی

از روش MTT (۳-(۴، ۵-دی‌متیل تیازول ۲-ایل)- ۲، ۵-دی‌فنیل تترازولیوم برماید) [1] جهت اندازه‌گیری سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی در برابر رده سلولی HT29 (شماره سلول IBRC C10097، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) استفاده گردید. سلول‌ها در محیط DMEM [2] حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو و پنی‌سیلین/ استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار گرفتند. میزان تقریباً ۱۰۰۰۰۰ سلول به هر یک از چاهک‌های ۹۶ خانه اضافه شد. سپس محیط کشت DMEM، ۲۰۰ میکرولیتر سرم جنینی گاو و دوزهای مختلف اسانس آویشن شیرازی (۱، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. تکثیر سلولی با استفاده از روش MTT بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون‌گذاری به صورت زیر اندازه‌گیری شد. ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد و صفحات به مدت ۳ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن قرار گرفتند و بعد از حذف محیط، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (ELX 808، Bio Tek Instruments، آمریکا) ثبت گردید. با استفاده از سلول‌های کنترل منحنی زنده‌مانی سلولی رسم شد (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

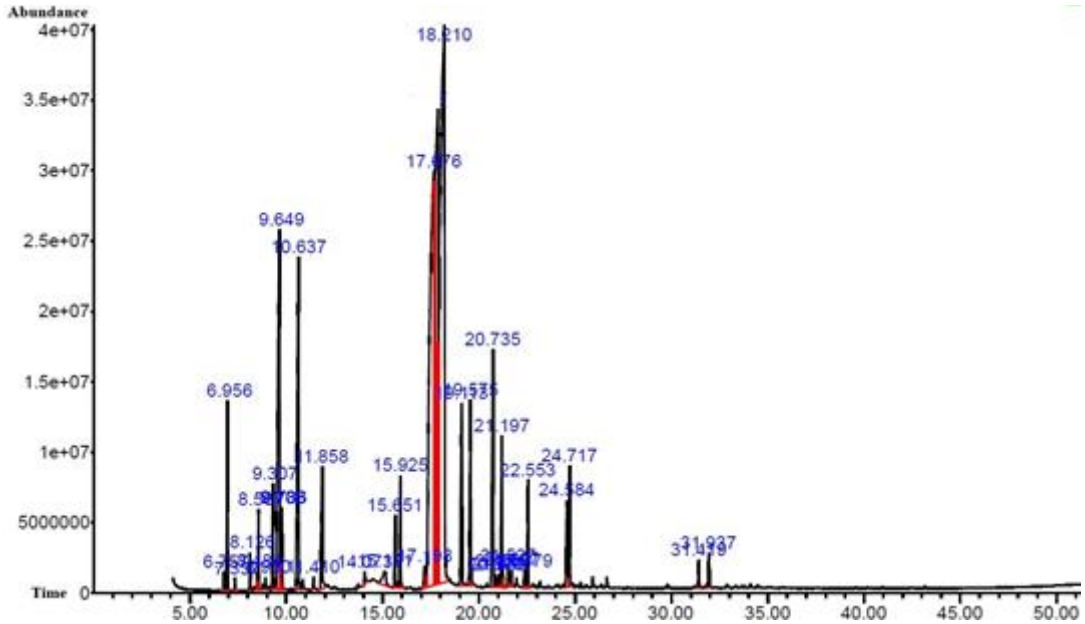
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شد. جهت مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) استفاده شد. آزمون‌های اندازه‌گیری میزان فنل، فلاونوئید و قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی در ۳ مرتبه تکرار شدند.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

نتایج حاصل از آنالیز شیمیایی اسانس آویشن شیرازی توسط کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی در جدول ۱، ذکر شده است. در شکل ۱، نمایی از کروماتوگرام آویشن شیرازی نشان داده شده است.



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس آویشن شیرازی (محور افقی زمان (دقیقه) و محور عمودی فراوانی است).

Fig. 1. Chromatogram of Shirazi thyme essential oil (horizontal axis of time (minutes) and vertical axis of frequency).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

1 (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyltetrazolium bromide)

2 Dulbecco's modified eagle medium

Table 1- Chemical composition of Shirazi thyme essential oil

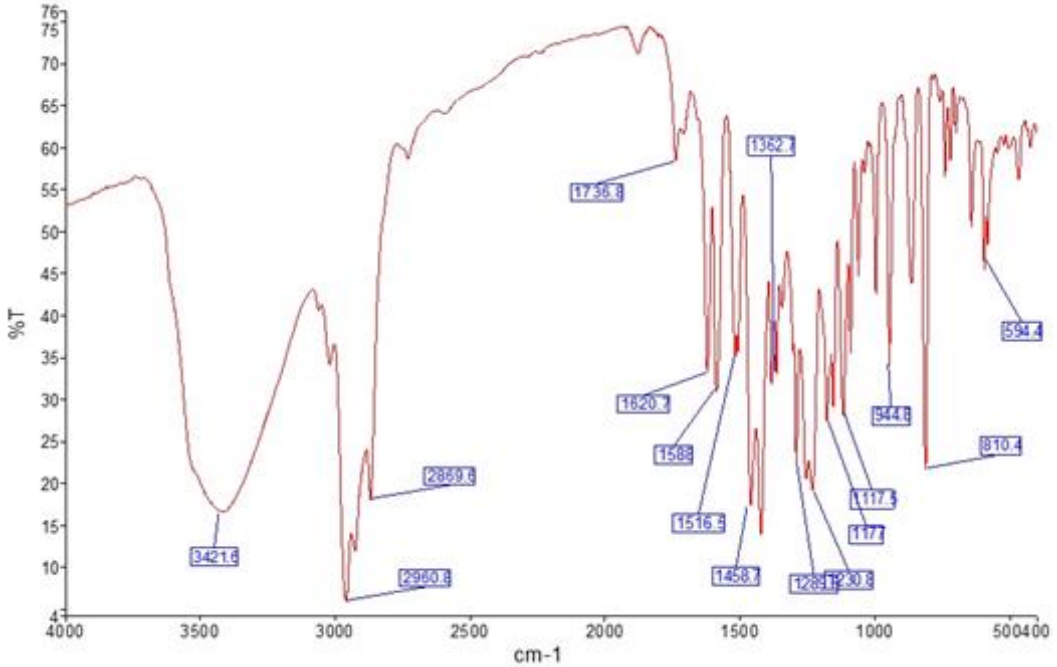
شماره NO.	ترکیبات تشکیل‌دهنده Compounds of constituent	زمان بازداری (دقیقه) Retention time (minutes)	درصد Percentage
1	α-thujene	6.75	0.13
2	α-pinene	6.95	1.46
3	Camphene	7.33	0.08
4	β-pinene	8.12	0.27
5	3-octanone	8.48	0.14
6	β-myrcene	8.56	0.63
7	Phellandrene	8.92	0.11
8	3-carene	9.31	1.05
9	Benzene	9.64	8.52
10	Limonene	9.70	0.57
11	Eucalyptol	9.78	0.51
12	γ-terpinene	10.64	5.27
13	α-terpinolene	11.41	0.08
14	Linalool	11.85	1.51
15	α-terpineol	15.11	0.58
16	Thymol	17.67	30
17	Carvacrol	18.21	39. 3
18	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	19.11	1.21
19	Caryophyllene	20.73	2.97
20	1H-Cyclopropa[a]naphthalene	20.87	0.12
21	Selina-3,7(11)-diene	21.05	0.12
22	Aromadendrene	21.19	1.65
23	β-selinene	21.26	0.12
24	α-humulene	21.52	0.21
25	Alloaromadendrene	21.69	0.18
26	Junipene	22.37	0.19
27	Ledene	22.55	1.05
28	Spathulenol	24.58	1.11
29	Naphthalene	24.71	1.28
کل Total			**99.21**

۲۹ ترکیب در اسانس آویشن شیرازی شناسایی شد که در مجموع ۹۹/۲۱٪ از اجزای تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بود. نتایج نشان داد که ترکیب کارواکرول و تیمول به ترتیب با ۳۹/۳٪ و ۳۰٪ بیش‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. سایر ترکیبات عمده تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی شامل بنزن (۸/۵۲٪)، گاماترپینن (۵/۲۷٪) و کاریوفیلن (۲/۹۷٪) بود.Moshafi و همکاران (۲۰۰۷)، در مجموع ۲۵ ترکیب از اسانس با استفاده از دستگاه GC/MS شناسایی کردند. این پژوهشگران گزارش کردند که ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی شامل: تیمول ۳۷/۵۹٪، کارواکرول ۳۳/۶۵٪، پاراسیمن۷/۷۲٪، گاماترپینن ۳/۸۸٪ و بتاکاریوفیلن ۲/۰۶٪ بودند. Shahsavari و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. با توجه به نتایج حاصل از دستگاه GC/MC کارواکرول ۲۶/۰۸٪، پاراسیمن ۲۰/۳۴٪ و تیمول ۱۷/۲۳٪ به‌عنوان ترکیبات غالب اسانس آویشن شیرازی شناسایی شدند. Nasiri و همکاران (۲۰۱۴)، گزارش کردند که تیمول (۵۰/۸٪)، کارواکرول (۱۴/۴٪) و پاراسیمن (۱۰/۶٪) ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی هستند. Najafpour Navaei و Mirza (۲۰۱۵)، ترکیبات شیمیایی اسانس سرشاخه‌های گلدار آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج GC/MS در مجموع ۲۷ ترکیب در تمامی نمونه‌ها شناسایی شد که دو ترکیب کارواکرول و تیمول اجزای اصلی اسانس سرشاخه-های گلدار آویشن شیرازی بودند. Mehran و همکاران (۲۰۱۶) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج ترکیبات اصلی شناسایی شده اسانس آویشن شیرازی توسط دستگاه GC/MS عبارتنداز: کارواکرول ۵۷/۷٪، تیمول ۱۳/۴٪ و پاراسیمن ۷/۹٪ بودند.Avaei و همکاران (۲۰۱۵) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی در خراسان را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که در مجموع ۴۳ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی شامل: تیمول ۴۲/۴۶٪، کارواکرول ۱۶/۸۵٪، پاراسیمن ۱۰/۶۲٪، گاماترپینن ۷/۲۶٪ و آلفاپینن ۳٪ بود. Sadeghi و همکاران (۲۰۱۵) ترکیب شیمیایی اسانس آویشن شیرازی قسمت‌های مختلف

استان فارس را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج حاصل از GC/MS در مجموع ۵۰ ترکیب فرار شناسایی شد که ترکیبات اصلی اسانس‌های آویشن شیرازی شناسایی شده شامل: لینالول ۵۵/۶۹-۰/۹۳٪، تیمول ۳۷/۵۱-۲/۶۶٪، کارواکرول ۵۹/۷۸-۱۴/۳۷٪، گاماترپینن ۱۱/۳۵-۲/۲۸٪، پاراسیمن ۷/۹-۱/۲۳٪، کارواکرول متیل اتر ۶/۰۸-۰/۹٪، آلفاپینن ۵/۱۳-۱/۳٪ و میرسن ۲/۷۲-۰/۵۱٪ بود. Ramezanian و همکاران (۲۰۱۶) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج در مجموع ۳۹ ترکیب از اسانس آویشن شیرازی با استفاده از GC/MS شناسایی شد که ترکیبات اصلی شناسایی شده عبارتنداز: تیمول ۵۰/۶۴٪، کارواکرول ۱۸/۱۶٪، پاراسیمن ۱۰/۵۹٪، گاماترپینن ۶/۸۲٪، آلفاپینن ۲/۹۳٪، تیمول استات ۲/۳۸٪، آلفاترپینن ۲/۳۲٪، ای-کاریوفیلن ۱/۲۴٪ و میرسن ۱/۰۷٪ بود. Mahboubi و همکاران (۲۰۱۷) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج GC/MS محدوده ترکیبات اصلی شناسایی شده چند نمونه از اسانس آویشن شیرازی شامل تیمول ۴۱/۲-۲۵/۸٪، کارواکرول ۳۴/۳-۰/۵٪، کارواکرول متیل اتر ۲۸/۳-۱/۸٪، پاراسیمن ۱۲/۱-۲/۳٪، لینالول ۶/۵-۱/۳٪، گاماترپینن ۶/۵-۰/۹۲٪ و آلفاترپینن ۵/۱-۰/۲۶٪ بود. Mojaddar Langroodi و همکاران (۲۰۱۹) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج در مجموع ۳۶ ترکیب از اسانس آویشن شیرازی توسط دستگاه GC/MS مشخص شد که کارواکرول ۴۶/۸۲٪ به‌عنوان ترکیب اصلی معرفی گردید. Alsaraf و همکاران (۲۰۲۰) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن عمانی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج GC/MS در مجموع ۱۱ ترکیب فرار از اسانس آویشن عمانی مشخص شد که کارواکرول ۵۹/۲۹٪ و گاماترپینن ۲۹/۱۲٪ به‌عنوان ترکیبات اصلی شناسایی شدند. مقایسه نتایج حاصل از پژوهش حاضر با مطالعه‌های مشابه که در بالا ذکر شدند نشان داد به طور کلی در اکثر مطالعات پیشین نیز ترکیبات کارواکرول و تیمول ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. هر چند لازم به ذکر است که درصد تشکیل دهنده اجزای اسانس آویشن شیرازی در مطالعات پیشین دارای تفاوت‌هایی می‌باشند که دلیل این امر را می‌توان به عواملی مانند شرایط آب و هوایی، محل رشد گیاه، نوع خاک، مرحله برداشت گیاه، روش خشک کردن، نحوه استحصال اسانس و... نسبت داد.

طیف FTIR اسانس آویشن شیرازی

در شکل ۲، طیف FTIR اسانس آویشن شیرازی نشان داده شده است.



شکل۲- طیف FTIR اسانس آویشن شیرازی.

Fig. 2. FTIR spectrum of Shirazi thyme essential oil.

پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} ۸۵۰ -۵۵۰ مربوط به پیوندهای کششی (C-CL) می‌باشد. محدوده بین cm^{-1} ۹۵۰- ۹۱۰ به‌ویژه پیک‌های مربوط به ناحیه cm^{-1} ۹۹۴/۸ مربوط به پیوندهای (O-H) گروه‌های کربوکسیلیک اسید می‌باشد. وجود پیک در عدد موجی

cm^{-1}۱۳۲۰– ۱۰۰۰ نشان‌دهنده پیوندهای (O–C) می‌باشد که می‌تواند مربوط به ترکیباتی همچون الکل‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و اتر باشد. وجود پیک در عدد موجی cm^{-1} ۱۴۶۵/۷۸– ۱۳۶۲/۷ به‌ویژه پیک موجود در عدد موجی cm^{-1} ۱۴۵۸/۷ نشان‌دهنده گروه‌های (CH_2 و CH_3) می‌باشد. محدوده بین cm^{-1} ۱۵۵۰– ۱۴۷۵ و cm^{-1} ۱۶۵۰– ۱۵۸۰ به‌ترتیب مربوط به پیوندهای (N-O) و (C-C) باشد. وجود پیک در عدد موجی cm^{-1} ۱۷۳۶/۸ نشان‌دهنده پیوندهای کتونی (C=O) می‌باشد که می‌تواند مربوط به ترکیباتی همچون آلدهیدها باشد. محدوده بین cm^{-1} ۳۰۰۰– ۲۸۰۰ به ویژه پیک‌های مربوط به ناحیه cm^{-1} ۲۸۶۹/۶ تا ۲۹۶۰/۸ مربوط به حالت‌های کششی پیوندهای (C-H) می‌باشد. که این پیک‌ها اغلب مربوط به ترکیبات الکلی موجود در اسانس می‌باشد (Cui et al., 2007; Mohammed et al., 2016). پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} ۳۵۰۰– ۳۰۰۰ به‌ویژه پیک موجود در ناحیه cm^{-1} ۳۴۲۱/۶ مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل (O-H) که ممکن است مربوط به گروه‌های الکلی یا اسیدهای کربوکسیلیک باشد.

فنل کل، فلاونوئید کل و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی

میزان فنل کل و فلاونوئید اسانس آویشن شیرازی به‌ترتیب ۶۴/۰۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و ۱۱/۶۸ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم بود. نتایج بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی با رادیکال های آزاد DPPH و ABTS در جدول ۲، ذکر شده است. نتایج نشان داد که میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی افزایش پیدا کرد. میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از DPPH و ABTS در غلظت ppm ۱۰۰۰ به‌ترتیب ۶۳/۶۹ و ۶۴/۳۳ بود. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با مطالعات پیشین نشان داد که تفاوت‌های در میزان فنل و فلاونوئید کل و قدرت آنتی‌اکسیدانی در این مطالعه با سایر پژوهش‌های مختلف به شرایط مختلف آب و هوایی و جغرافیایی محل رشد گیاه از قبیل نوع خاک، میزان آب و ارتفاع محیط و همچنین روش‌های مختلف اندازه‌گیری و بیان نتایج این دو ترکیب وابسته می‌باشد.

Moshafi و همکاران (۲۰۰۷)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج اسانس آویشن شیرازی با IC_{50} برابر ۱± ۲۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست رادیکال DPPH را مهار کند. Mirzaee و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی عصاره هیدروالکلی آویشن دنایی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد محتوای فنل کل طبق روش فولین سیوکالتو برابر ۱۱/۶± ۹۷/۷ میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره و میزان فلاونوئید کل برابر ۲/۸ ±۳۷/۵ میلی‌گرم روتین در گرم عصاره بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از روش ABTS برابر ۳± ۴۰۳ میکرومول ترولکس در گرم عصاره تعیین شد. Sharafati Chaleshtori و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج محتوای فنل کل عصاره آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۱۱/۰۶± ۲۸۳/۴۳ میلی‌گرم در گرم معادل گالیک اسید و میزان ترکیبات فلاونوئیدی برابر ۴/۵± ۱۳۱/۲۳ میلی‌گرم در گرم معادل روتین بود.

Khoshsokhan و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی عصاره برخی جمعیت‌های آویشن کوهی و دنایی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد، میزان IC_{50} جمعیت‌های مختلف آویشن کوهی مطابق روش رادیکال آزاد DPPH از ۲۰/۹۸ تا ۴۸/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان ترکیبات فنلی مطابق روش فولین سیوکالتو از ۴۲/۶ تا ۶۷/۶۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم متغیر بودند. Ahmadi و همکاران (۲۰۱۶)، تأثیر ترکیبات فنلی را بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد محتوای فنلی عصاره آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۲/۳± ۲۲۳/۵۵ میلی‌گرم در هرگرم عصاره بود. Zangiabadi و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنل کل اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج محتوای فنلی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۲/۹± ۳۲۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر میلی‌لیتر گزاراش شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با استفاده از روش DPPH برابر ۰/۰۳± ۰/۷۸ و با استفاده از روش ABTS برابر ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} تعیین شد. Kavoosi و همکاران (۲۰۱۲) قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش کردند که قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس با استفاده از مهار رادیکال ABTS برابر ۰/۷۵± ۲/۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. Aliakbarlu و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج محتوای فنلی برای اسانس آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر با ۴۴/۸۱ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گزارش شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی طبق روش DPPH برابر با ۸۸/۶۳٪ گزارش شد. El Abed و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس گیاه *Thymus capitata* را مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با استفاده از روش DPPH برابر ۴۴/۱۶ و با استفاده از روش ABTS برابر ۰/۴۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید. Kavoosi و Rabiei (۲۰۱۵) فعالیت آنتی-اکسیدانی اسانس ۶ کموتایپ از آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج محتوای فنل تام ۶ کموتایپ با استفاده از روش

فولین سیوکالتو برابر ۰/۹± ۱۴/۲، ۰/۸± ۱۲/۸، ۰/۷± ۱۱/۴، ۰/۸± ۱۱/۲، ۰/۵± ۹/۲، ۰/۷± ۹/۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با استفاده از روش ABTS برابر ۰/۸± ۲/۸، ۰/۷± ۳/۱، ۰/۹± ۳/۶، ۰/۶± ۳/۸، ۰/۵± ۴/۷، ۹/۷± ۴/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برحسب IC_{50} گزارش شد. Mortazaei و همکاران (۲۰۱۶) محتوای فلاونوئیدی و فنل کل عصاره آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج محتوای فنل کل عصاره آویشن شیرازی با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۱۱/۰۶± ۲۸۳/۳۳ میلی‌گرم گالیک اسید اکی‌والان بر گرم بود. محتوای فلاونوئیدی برابر ۴/۵± ۱۳۱/۳۳ میلی‌گرم اکی‌والان روتین بر گرم گزارش شد. Geraminezhad و Roostaei-Ali Mehr (۲۰۱۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فلاونوئیدی و پلی‌فنل کل اسانس آویشن شیرازی را مورد ارزیابی قرار دادند. مطابق نتایج درصد فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی مطابق روش DPPH برابر با ۰/۰۳۴± ۹۱/۴۲۴ بود. محتوای فلاونوئیدی اسانس آویشن شیرازی برابر ۰/۰۴± ۱۲/۹۸۲ میلی‌گرم کاتچین بر میلی‌لیتر گزارش شد. محتوای پلی‌فنل کل طبق روش فولین سیوکالتو برابر ۰/۰۰۳± ۲/۲۲۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر میلی‌لیتر بود. Aljabeili و همکاران (۲۰۱۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن (آویشن باغی) را مورد ارزیابی قرار دادند. طبق نتایج محتوای فنل کل اسانس با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۱/۹± ۱۷۷/۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن با استفاده از روش DPPH برابر ۶/۷± ۱۴۹/۸ میکرومول ترولکس بر گرم و با استفاده از روش ABTS برابر ۴/۹± ۱۹۲/۳ میکرومول ترولکس بر گرم تعیین گردید.

Rezzoug و همکاران (۲۰۱۹) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره اتانولی گیاه *Thymus algeriensis Boiss* را مورد ارزیابی قرار دادند. مطابق نتایج محتوای فنل کل عصاره گیاه با استفاده از روش فولین سیوکالتو برابر ۱± ۱۲۵ و محتوای فلاونوئیدی برابر ۱± ۱۱۸ میلی‌گرم بر گرم بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره گیاه با استفاده از روش DPPH به‌ترتیب برابر ۴/۵۱± ۱/۴۳۷ و ۰/۰۱۰± ۱/۵۶۰ و با استفاده از روش ABTS به‌ترتیب برابر ۰/۲۰۳± ۰/۸۹۶۰ و ۰/۱۹۵± ۱/۷۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برحسب IC_{50} گزارش شد. Golkar و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی آویشن شیرازی استان یزد و فارس را مورد بررسی قرار دادند که محتوای فنل کل آن‌ها با استفاده از روش فولین سیوکالتو به ترتیب برابر ۱/۳۵± ۹۸/۸۳ و ۱/۷۴± ۱۰۲/۶۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و محتوای فلاونوئید کل به‌ترتیب برابر ۰/۹۱± ۴۲/۳۶ و ۲/۲۱± ۴۲/۲۱ میلی‌گرم روتین اکی‌والان بر گرم، همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با استفاده از روش DPPH به‌ترتیب برابر ۰/۰۳± ۰/۲۴ و ۰/۰۷± ۰/۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} گزارش گردید.

جدول ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی با رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS

Table 2- Antioxidant activity of Shirazi thyme essential oil with DPPH and ABTS free radicals

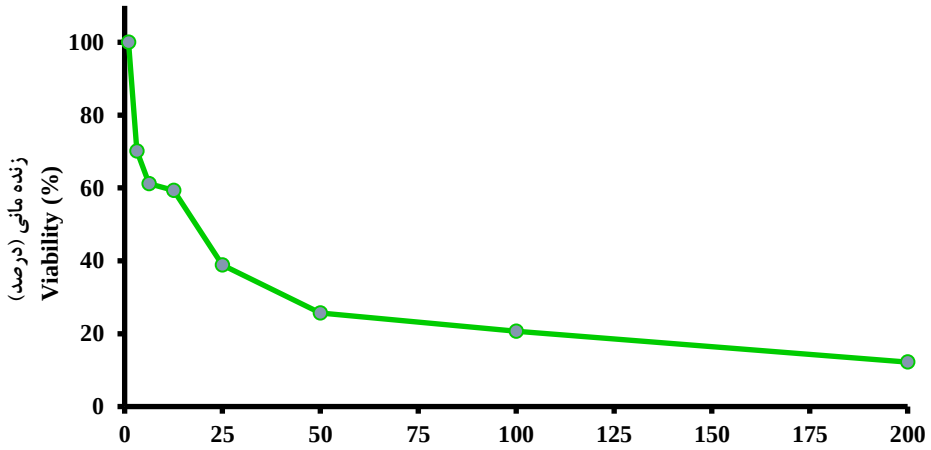
غلظت اسانس (ppm)	غلظت اسانس (ppm)	
	DPPH	ABTS
500	39.88±0.52^{F}	37.46±0.60^{F}
600	42.46± 0.44^{E}	41.28± 0.49^{E}
700	46.42± 0.67^{D}	49.23± 0.35^{D}
800	51.38± 0.38^{C}	53.19± 0.28^{C}
900	54.75± 0.55^{B}	58.10± 0.38^{B}
1000	63.69± 1.05^{A}	64.33± 0.67^{A}

حروف غیرمشابه در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.

سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلول HT29

نتایج سمیت سلولی غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولی HT29 در شکل ۳، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که زنده‌مانی سلول‌های HT29 در غلظت‌های ۱، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۷۰/۱۵، ۶۱/۱۹، ۵۹/۳۳، ۳۸/۸۳، ۲۵/۶۸، ۲۰/۶۵ و ۱۲/۲ درصد بود. بر اساس نتایج مشاهده شده، با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی، تأثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی آن کاهش یافت. ترکیبات فنولی اثر ضدسرطانی خود را از طریق جلوگیری از آنزیم‌های متابولیک دخیل در فعال‌سازی عوامل سرطان‌زا و یا توقف سیکل سلول سرطانی بروز می‌دهند (Abdelhady et al., 2012). Rahimifard و همکاران (۲۰۰۹)، اثر سمیت سلولی اسانس و عصاره آویشن شیرازی را بر رده سلولی اپی‌تلیال کلیه میمون سبز آفریقایی Vero و رده‌های سلولی سرطان حلق Hep2 و سرطان دهانه رحم Hela با استفاده از

روش MTT مورد بررسی قرار دادند. برحسب نتایج اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با عصاره آن در غلظت‌های پایین‌تر اثر سمیت سلولی نشان داد. اسانس آویشن شیرازی بر رده سلول Hep2 در غلظت ppm ۰۴۶/۱۸۷۵- صفر، رده سلول Hela در غلظت ppm ۰۹۳/۳۷۵- صفر و رده سلول Vero در غلظت ppm ۰۹۳/۱۸۷۵- صفر اثر سمیت سلولی داشت. Shokrzadeh و همکاران (۲۰۱۰) اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن شیرازی را بر سلول‌های عادی، رده‌های سلولی سرطان کبد HepG2 و سرطان تخمدان SKOV3 در مقایسه با سیس پلاتین مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج عصاره آویشن شیرازی در غلظت ۱۵۰ -۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با سیس پلاتین IC_{50} بالاتری را نشان داد. Janitermi و Nemati (۲۰۱۵) اثر سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی را بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و سلول‌های فیبروبلاست طبیعی در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج بیش‌ترین اثر سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی بر رده سلولی MCF-7 در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد و مقادیر IC_{50} پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب ۱۵۸/۹۷، ۳۰/۴۴ و ۳۶/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین بیشترین اثر اسانس آویشن شیرازی بر مهار رشد سلول فیبروبلاست طبیعی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد. در پژوهش ما نیز با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی اثر سمیت سلولی به‌طور معنی‌داری در سطح ۵٪ افزایش پیدا کرد.



غلظت های مختلف اسانس آویش شیرازی (میلی گرم بر میلی لیتر)

Different concentrations of Shirazi thyme essential oil (mg/ml)

شکل ۳- اثر سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر زنده‌مانی رده سلولی HT29.

Fig. 3. Cytotoxic effect of varius concentrations of Shirazi thyme essential oil on survival of HT29 cell line.

Janitermi و همکاران (۲۰۱۵) اثر سمیت سلولی اسانس آویشن شیرازی را بر رده سلولی سرطان معده AGS و سلول‌های فیبروبلاست طبیعی در پلیت ۹۶ خانه با حضور و بدون حضور غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی صفر، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج اسانس آویشن شیرازی اثر مهارکنندگی قوی در برابر رده سلولی سرطان معده AGS در مقایسه با شاهد داشت و بیش‌ترین اثر سمیت سلولی اسانس مربوط به غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۹۰/۰۱٪) و زمان ۲۴ ساعت بود. همچنین بیش‌ترین اثر اسانس بر مهار رشد سلول‌های فیبروبلاست طبیعی در غلظت۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۹۸/۸۲٪) پس از ۴۸ ساعت گزارش شد. در پژوهش حاضر نیز با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی میزان سمیت سلولی نیز افزایش پیدا کرد. Sharififar و همکاران (۲۰۱۷) اثر سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن شیرازی و فراکسیون‌های آن (عصاره متانول، کلروفرم و اترپترولیوم) را بر رده‌های سلولی سرطان کلورکتال انسان SW-48 و سرطان روده بزرگ HT-29 با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار دادند. بیش‌ترین اثر سمیت سلولی بر رده سلولی HT-29 نشان داده شد. همچنین، عصاره کل آویشن شیرازی و فراکسیون اترپترولیوم اثرات سمیت سلولی را با مقادیر IC_{50} برابر ۴۴/۲۲ و ۳۳/۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر رده‌های سلولی SW-48 و HT-29 نشان دادند که طبق نتایج آویشن شیرازی اثر

سایکوتوکسیک مناسبی در برابر هر دو رده سلولی سرطان روده بزرگ انسان داشت. در مطالعه ما نیز اسانس آویشن شیرازی دارای سمیت سلولی مناسبی بر رده سلولی HT29 بود. Khakzad و همکاران (۲۰۱۹) اثر سیتوتوکسیک اسانس آویشن شیرازی را بر رده سلول سرطانی اریتروميلوئیدی K562 و سلول‌های نرمال PBMC در غلظت‌های صفر، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اسانس آویشن شیرازی در حداکثر غلظت (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و زمان ۷۲ ساعت بیش‌ترین اثر سمیت سلولی را در رده سلولی K562 و سلول‌های نرمال PBMC داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان فنل کل و فلاونوئید اسانس آویشن شیرازی به‌ترتیب ۶۴/۰۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و ۱۱/۶۸ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم بود. نتایج نشان داد که میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی افزایش پیدا کرد. میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از DPPH و ABTS در غلظت ppm ۱۰۰۰ به‌ترتیب ۶۳/۶۹ و ۶۴/۳۳ بود. نتایج شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی نشان داد که ترکیب کارواکرول و تیمول به‌ترتیب با ۳۹/۳٪ و ۳۰٪ بیش‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس بود. بخشی از قدرت آنتی اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی را می‌توان به ترکیبات فنلی نسبت داد. نتایج نشان داد، با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی، تأثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی آن کاهش یافت. با توجه به نتایج قدرت آنتی‌اکسیدانی، فنل و فلاونوئید کل اسانس آویشن شیرازی به‌نظر می‌رسد بتوان از گیاه آویشن شیرازی به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی بهره برد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Abdalan, S., Baghbani-Arani, F. & Sadat Shandiz, S. A., (2018). Evaluation of Anticancer Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of Quercusin Fectoria Leaf against Colon Cancer HT29 Cell Line. Journal of Arak University Medical Sciences, 21(4), 48-57. (In Persian)
2. Abdelhady MI, Aly HAH., 2012. Antioxidant antimicrobial activities of Callistemon comboynensis essential oil. Free Radical Antioxid, 2(1), 37-41. https://doi.org/10.5530/ax.2012.2.8
3. Aljabeili, H. S., Barakat, H. & Abdel-Rahman, H. A., (2018). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). Food and Nutrition Sciences, 9(05), 433-446.doi: 10.4236/fns.2018.95034
4. Ahmadi, E., Abdollahi, A., Najafipour, S., Meshkibaf, M.H., Fasihi Ramandi, M., Namdar, N., Abdollahi Kheyr Abadi, S., Mousavi, S. M., Samizadeh, B. & Allahverdi, G., (2016). Surveying the Effect of the Phenol Compounds on Antibacterial Activity of Herbal Extracts: In vitro Assessment of Herbal Extracts in Fasa-Fars Province. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 6(2), 210-220. (In Persian)
5. Aliakbarlu, J., Sadaghiani, S. K. & Mohammadi, S., (2013). Comparative evaluation of antioxidant and antifood-borne bacterial activities of essential oils from some spices commonly consumed in Iran. *Food Science and Biotechnology*, 22(6), 1487-1493. https://doi.org/10.1007/s10068-013-0242-2
6. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F.,Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S.A. & Mohebbi, M., (2017). Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 515-526. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.055
7. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. & Falah, F., (2019). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of Syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens. Potravinarstvo Slovak *Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.
8. Alsaraf, S., Hadi, Z., Al-Lawati, W. M., Al Lawati, A. A. & Khan, S. A., (2020). Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with in silico studies of its major constituent. Journal of King Saud University-Science, 32(1),1-21. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.09.006
9. Amin, M., Kalantar, E., Mohammad-Saeid, N. & Ahsan, B., 2010. Antibacterial effect and physicochemical properties of essential oil of Zataria multiflora Boiss. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(6), 439-442.https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60105-8

10. Avaei, A., Mohamadi Sani, A. & Mahmoodzadeh Vaziri, B., (2015). Chemical composition and antimicrobial effect of the essential oil of Zataria multiflora Boiss endemic in Khorasan-Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3), 181-185. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60649-6
11. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B. & Mehrnia, M. A., (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using Lepidium sativum seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. Food Science and Biotechnology, 29(5), 717-728. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00715-4
12. Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M., Cabral, C., Pires, I. (2018). Anticancer properties of essential oils and other natural products. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 3149362. https://doi.org/10.1155/2018/3149362
13. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5
14. Brodowska, K. M., (2017). Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*, 7(2), 108-123.
15. Cui, S. W., Phillips, G. O., Blackwell, B. & Nikiforuk, J., (2007). Characterisation and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. senegal with enhanced properties (Acacia (sen) Supergum (TM)): Part 4. Spectroscopic characterisation of Acacia senegal var. senegal and Acacia (sen) Supergum (TM) arabic. *Food Hydrocolloids*, 21(3): 347–352.
16. Dabbagh Moghaddam, A., Kazemi, M., Movaffagh, J. & Sharifan, A., (2019). Design of Zein Electrospinning Nanofiber Packaging Containing Zataria Multiflora Essential Oil to Preserve the Ration Food. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 16(3), 91-102. (In Persian)
17. Dalali Isfahani, L., Monajemi, R. & Amjad, L., (2013). Cytotoxic Effects of Extract and Essential oil Leaves of *Achillea wilhelmsii* C.Koch on Colon Cancers Cells. *Experimental Animal Biology*, 1(3), 1-6. (In Persian)
18. El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., Marzouki, M. N. & Ben Hadj Ahmed, S., (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against Listeria monocytogenes inoculated in minced beef meat. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014. https://doi.org/10.1155/2014/152487
19. Fazli, R., Nazarnezhad, N. & Ebrahimzadeh, M., (2013). Evaluation of the Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of Beech, Hornbeam and Poplar Barks. Journal of Forest and Wood Products, 66(3), 339-349. (In Persian)
20. Geraminezhad, F. & Roostaei-Ali Mehr, M., 2018. Effect of Zataria multiflora essential oil on rooster semen during storage at 4 C. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology, 10(1), 21-26.
21. Golkar, P., Mosavat, N. & Jalali, S. A. H., (2020). Essential oils, chemical constituents, antioxidant, antibacterial and in vitro cytotoxic activity of different Thymus species and *Zataria multiflora* collected from Iran. *South African Journal of Botany*, 130, 250-258. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.005
22. Hossain, M. A. & Rahman, S. M. M., (2011). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 44(3), 672-676. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.036
23. Huyut, Z., Beydemir, Ş. & Gülçin, İ., (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research International*, . https://doi.org/10.1155/2017/7616791
24. Janitermi, M., Nemati, F. & Mohammadpour, G., (2015). Cytotoxic effect of Zataria multiflora on gastric cancer cell line (AGS) and normal fibroblast cells. Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 36(3), 1876-1884.
25. Janitermi, M. & Nemati, F., (2015). Cytotoxic effect of Zataria multiflora on breast cancer cell line (MCF-7) and normal fibroblast cells. Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 36(3), 1895-1904.
26. Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, K.S. & Apak, R., (2010). Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. *Journal of Food Chemistry*, 120(4), 1201-1209. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.065
27. Jooyandeh, H. & Haji Ebrahimi Forushani, Z., (2019). Extraction of polysaccharide from Pleurotus ostreatus by ultrasound and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 16(89), 85-100. (In Persian)
28. Kavoosi, G. & Rabiei, F., (2015). Zataria multiflora: chemical and biological diversity in the essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 27(5), 428-436. https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1031917
29. Kavoosi, G., Purfard, A. M. & Aram, F., 2012. Radical scavenging properties of essential oils from Zataria multiflora and Ferula assafoetida. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1351-S1356. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60415-8
30. Khakzad, S., Rahmani, F., Hojjati, M. & Tabandeh, M.R., (2019). Anti-carcinogenic effects of *Satureja khuzistanica* and *Zataria multiflora* essential oils on K562 cell line proliferation. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 2(2), 127-132.

31. Khazraei-Moradian, S., Andalib, A., Ganjalikhani-Hakemi, M., Safari, Z., Zare, A. & Kardar, G., (2014). The Effect of Protein Extract of Licorice Root in proliferation of HT-29 and CT26 Cancer Cell Lines. *Journal of Isfahan Medical School*, 32(298), 1-9. (In Persian)
32. Khoshsokhan, F., Babalar, M., Poormeidani, A. & Fatahi, M. R., (2015). Antioxidant Activity, Total Phenolics and Oil Content of Some *Thymus kotschyanus* and *Thymus daenensis* Populations. *Plant Production Technology*, 15(1), 153-162. (In Persian)
33. Mahboubi, M., Heidarytabar, R., Mahdizadeh, E. & Hosseini, H., (2017). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus species* and *Zataria multiflora* essential oils. *Agriculture and Natural Resources*, 51(5), 1-18. https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.02.001
34. Mantashlo, J., Deljoo, A. & Piri, Kh. (2017). The Study of Flavonoids and Antioxidant Power of Etanolic, Metanolic, Hydroalcholic and Etylacetatic Extracts of Branch and Stem Bark of Salix Alba. *Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology)*, 30(3), 381-391. (In Persian)
35. Mehran, M., Hosseini, H., Hatami, A., Taghizade, M. & Safaei, A., (2016). Investigation of seven species of essential oils of thyme and comparison their antioxidant properties. *Journal of Medicinal Plants*, 15(58), 134-140. (In Persian)
36. Mehrnia, M. A., Dehghan, N. & heidari, M., (2019). Effect of drying method and solvent type on antioxidant properties and chemical composition of sacred fig (*Ficus religiosa*). *Journal of Food Science and Technology*, 16(95), 27-37. (In Persian)
37. Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M., (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255-260.
38. Mirzaee, A., Jaberi Hafashani, H. & Madani, A., (2012). Antioxidant activities, total phenols and total Flavonoids assay of *Origanurm vulgare*, *Teucrium polium* and *Thymus daensis*. *Hormozgan Medical Journal*, 15(4), 285-294. (In Persian)
39. Mohammed, K. A. K., Abdulkadhim, H. M. & Noori, S. I., (2016). Chemical composition and anti-bacterial effects of clove (*Syzygium aromaticum*) flowers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(2), 483-489.
40. Mojaddar Langroodi, A., Tajik, H. & Mehdizadeh, T., (2019). Antibacterial and antioxidant characteristics of *Zataria multiflora* Boiss essential Oil and hydroalcoholic extract of *Rhus coriaria* L. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 6(1), 16-24.
41. Mortazaei, S., Mahmoudvand, H. & Rafieian, R., 2016. Phytochemical properties of some Iranian medicinal plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 3427-3432.
42. Moshafi, M. H., Mansouri, Sh., Sharififar, F. & Khoshnoodi, M., (2007). Antibacterial and Antioxidant Effects of the Essential Oil and Extract of *Zataria Multiflora* Boiss. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 14(1), 33-43. (In Persian)
43. Najafpour Navaei, M. & Mirza, M., (2015). Essential Oil Composition of *Zataria Multiflora* Boiss. In Different Province of Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medical Plants*, 2(4), 43-49. (In Persian)
44. Nasiri, E., Moosavi-Nasab, M., Shekarforoush, S. S. & Golmakani, M. T., (2014). The effects of *Zataria multiflora* on inhibition of polyphenoloxidase and melanosis formation in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 23(3), 109-118. (In Persian)
45. Rahimifard, N., Pakzad, S. R., Shoeibi, Sh., Hedayati, M. H., Hajimehdipour, H., Motaharinia, V., Mehrafshan, L., Javadi A. & Pirali Hamedani, M., (2009). Effects of Essential oil and Extract of *Thymus vulgaris*, *Zataria multiflora* and *Eugenia caryophilata* on Vero, Hela, HepII cell lines by MTT Assay. J*ournal of Medicinal Plants*, 8(30), 152-156. (In Persian)
46. Ramezanian, A., Azadi, M., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. & Saharkhiz, M.J., (2016). Effect of *Zataria multiflora Boiss* and *Thymus vulgaris* L. essential oils on black rot of 'Washington Navel'orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 152-158. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.011
47. Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., Roberta, A., Guido, F., Kilincarslan, O., Mammadov, R. & Bardaweel, S. K., (2019). Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 146. https://doi.org/10.1186/s12906-019-2556-y
48. Sadeghi, H., Robati, Z. & Saharkhiz, M. J., (2015). Variability in Zataria multiflora Bioss. essential oil of twelve populations from Fars province, Iran. Industrial Crops and Products, 67, 221-226. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.021
49. Salhe Abadi, S. & Mehraban Sang Atash, M., (2015). Evaluation of the antioxidant activity and total phenols, flavonoids in methanolic, dichloromethane and ethyl acetate extracts of aerial parts of *Rubia florida*. J*ournal of North Khorasan University of Medical Sciences*, 7(1), 101-112. (In Persian)

50. Seyedalipour, B., Hasani, A., Ebrahimzadeh, M. A. & Taravati, A., (2016). Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic contents of extracts taken from aerial parts of *Ballota platyloma* using three different methods: percolation, ultrasonic and polyphenolic fraction. *Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 20(2), 147-156.
51. Shahsavari, N., Barzegar, M., Sahari, M. A. & Naghdi Badi, H., (2008). An Investigation on the Antioxidant Activity of Essential Oil of *Zataria multiflora* Boiss. in Soy Bean Oil. *Journal of Medicinal Plants*, 7(28), 56-68. (In Persian)
52. Sharafati Chaleshtori, R., Rafieian Kopaei, M., Rokni, N., Mortezaei, S. & Sharafati Chaleshtori, A., (2013). Antioxidant Activity of *Zataria Multiflora* Hydroalcoholic Extract and Its Antibacterial Effect on Staphylococcus Aureus. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 22(1), 88-94. (In Persian)
53. Sharififar, F., Miri-Moghaddam, M., Nematollahi-Mahani, S. N., Forootanfar, H. & Asgharian Rezee, M., (2017). Cytotoxicity effect of *Zataria multiflora* Boiss. on two human colon carcinoma cell lines. *Research Journal of Pharmacognosy*, 4(4), 65-70.
54. Shokrzadeh, M., Azadbakht, M., Ahangar, N., Naderi, H. & Saeedi Saravi, S. S., (2010). Comparison of the cytotoxic effects of Juniperus sabina and *Zataria multiflora* extracts with Taxus baccata extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. *Pharmacognosy Magazine*, 6(22), 102-105. DOI: 10.4103/0973-1296.62894
55. Symonowicz, M. & Kolanek, M., (2012). Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnology and Food Sciences*, 76(1), 35-41.
56. Yonesi, B., Mirzaie, A. & Aliasgari, E., (2017). Cytotoxicity and apoptotic effect of oxaliplatin on colon cancer cell line (HT29) and analysis of caspase 3 and caspase 9 gene expression using Real Time PCR method. *Journal of Cell and Tissue*, 8(4), 364-373. (In Persian)
57. Zangiabadi, M., Sahari, M. A., Barzegar, M. & Naghdi Badi, H., (2012). *Zataria multiflora* and *Bunium persicum* essential oils as two natural antioxidants. *Journal of Medicinal Plants*, 11(41), 8-21.
58. Ziaee, E., Razmjooei, M., Shad, E. & Eskandari, M.H., (2018). Antibacterial mechanisms of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil against Lactobacillus curvatus. *LWT-Food Science and Technology*, 87, 406-412. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.089

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 218- 234

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۳۴-۲۱۸

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Investigation of synergistic effect of sumac extract and phosphatidyl ethanolamine on the chemical properties of mayonnaise

Zeynab Abarchai[1], Alireza Rahman[2*], Maryam Fahimdanesh[3]

Received: 2020.08.23
Accepted: 2020.12.19

How to cite this article:
Abarchai, Z., Rahman, A., Fahimdanesh, M. (2022). Investigation of synergistic effect of sumac extract and phosphatidyl ethanolamine on the chemical properties of mayonnaise. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 218-234.

Abstract

Introduction Sumac, due to its phenolic compounds, strong anti-oxidant strength and anti-coagulation, can be considered as one of the most popular additives in the food industry. The aim of this study was to investigate the synergistic effect of sumac and phosphatidylethanolamine on the chemical properties of mayonnaise.

Materials and Methods: In this research Sumac extract with 0.5,1 and 1.5 % and phosphatidyl ethanol amine with 0.01, 0.04 and 0.08 were used as native preservative. After extraction of sumac and evaluation of sumac extraction yield, total phenol and free radical inhibition test (DPPH) and Sensory evaluation were performed. Mayonnaise sauce analysis including peroxide index, Totox index, and acidity index were determined in production day, 1st, 2nd and 3rd month. The analysis was done by using completely randomized blocks design in 0.05 level and data were analyzed by two way Analysis variance (ANOVA) and SPSS software.

Results and Discussion: The results showed that with increasing the use of sumac extract and phosphatidylethanolamine extract, the peroxide and Tutox indices decreased significantly compared to the control ($p \geq 0.05$) Also, increasing the level of sumac extract in mayonnaise formulation, significantly increased the acidity index of mayonnaise treatments ($p \geq 0.05$). In treatments with higher levels of phosphatidylethanolamine, the increase in acidity of mayonnaise treatments was associated with less intensity during storage ($p \geq 0.05$). In the study of sensory properties, it was observed that with increasing the level of sumac extract, the amount of sensory content of the treatments was less on the day of production. Increasing the use of sumac extract the texture and color scores of mayonnaise treatments were significantly decreased ($p \geq 0.05$). In general, storage time showed a significant increase in the increasing of all mayonnaise indices ($p \geq 0.05$). Finally, the treatment of 1% sumac extract and 0.08% phosphatidyl ethanolamine was selected as the optimal combination. According to the obtained results, mayonnaise containing sumac extract can be introduced to the market as a natural and new functional product, because sumac plant has phenolic compounds, strong antioxidant power and antimicrobial properties. It can be used as one of the additives in the food industry.

Keywords: Mayonnaise sauce, Sumac extract, Phosphatidyl ethanol amine, Chemical properties.

1, 2 and 3. MSc student, Assistant professor and Associate professor, Department of Food Science and Technology, Ghods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, Respectively.
(*Corresponding Author Email: alireza_rahman@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2020.40122.0

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 218- 234

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۳۴-۲۱۸

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی اثر سینرژیستی عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین بر ویژگی‌های شیمیایی سس مایونز

زینب ابرچائی[۱]– علیرضا رحمن[۲*]– مریم فهیم دانش[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۹

چکیده

در این تحقیق عصاره سماق با مقادیر ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد و فسفاتیدیل اتانول آمین با مقادیر ۰/۰۱، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ درصد به‌عنوان نگهدارنده در سس مایونز مورد استفاده قرار گرفتند. پس از عصاره گیری و ارزیابی بازده استخراج سماق، فنول تام و میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH) ارزیابی شد. آزمون‌های سس مایونز شامل شاخص پراکسید، شاخص توتوکس، شاخص اسیدیته و ارزیابی حسی در بازه‌های زمانی روز تولید (روز صفر)، ماه اول، ماه دوم و ماه سوم بررسی شدند. تحقیق در قالب طرح کامل تصادفی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ صورت پذیرفت و نتایج با آزمون مقایسه میانگین دو طرفه (ANOVA) و توسط نرم‌افزار آماری SPSS آنالیز گردید. نتایج نشان داد که با افزایش میزان استفاده از عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین میزان شاخص پراکسید و شاخص توتوکس به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد کاهش داشت ($p\leq$۰/۰۵). همچنین افزایش میزان استفاده از عصاره سماق در فرمولاسیون سس مایونز به‌طور معنی‌داری شاخص اسیدیته تیمارهای سس مایونز را افزایش داد ($p\leq$۰/۰۵). در تیمارهایی دارای میزان بالاتر فسفاتیدیل اتانول آمین میزان افزایش اسیدیته تیمارهای سس مایونز در طی زمان نگهداری با شدت کمتری همراه بود ($p\leq$۰/۰۵). در بررسی خصوصیات حسی نیز مشاهده شد که با افزایش میزان استفاده از عصاره سماق، میزان مطلوبیت حسی تیمارها در روز تولید کمتر بود، استفاده از فسفاتیدیل اتانول آمین در مقادیر ۰/۰۸ به حفظ خصوصیات حسی بالاتری در مقایسه با تیمار شاهد منجر شد. افزایش میزان استفاده از عصاره سماق امتیازات بافت و رنگ ظاهری تیمارهای سس مایونز را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($p\leq$۰/۰۵). زمان به‌طورکلی افزایش معنی‌داری در افزایش کلیه شاخص‌های سس مایونز نشان داد ($p\leq$۰/۰۵). در نهایت تیمار ۱ درصد عصاره سماق و همچنین ۰/۰۸ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین به عنوان ترکیب بهینه انتخاب و معرفی گردید. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان سس مایونز حاوی عصاره سماق را به‌عنوان یک محصول طبیعی و سلامت‌بخش جدید به بازار معرفی نمود، زیرا گیاه سماق به علت دارا بودن ترکیب‌های فنولی، قدرت ضداکسندگی قوی و نیز خاصیت ضدمیکروبی می‌تواند به‌عنوان یکی از افزودنی‌های مطرح در صنعت غذا استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سس مایونز، عصاره سماق، فسفاتیدیل اتانول آمین، خصوصیات شیمیایی.

مقدمه

سس مایونز، یکی از قدیمی‌ترین سس‌ها می‌باشد، که به‌طور وسیعی در سراسر جهان مصرف می‌شود. طبق تعریف استاندارد ایران، سس مایونز نوعی امولسیون روغن در آب است که از امولسیون شدن روغن‌های گیاهی خوراکی (حداقل ۶۶ درصد) در یک فاز مایع حاوی سرکه به‌وجود می‌آید. امولسیون روغن در آب بوده و دارای بو و مزه ملایم است. رنگ آن کرم تا زرد کم رنگ و pH آن ۳/۶ تا ۴ بوده و نباید از ۴/۱ تجاوز نماید. مایونز، فرآورده غذایی نیمه جامد امولسیفیه شده‌ای (امولسیون روغن در آب) است، که از روغن‌های گیاهی خوراکی، ماده اسیدی‌کننده، تخم‌مرغ و ترکیبات اختیاری (مانند خردل، نمک، شیرین‌کننده کربوهیدراته و ادویه) تهیه می‌شود (Institute of standards and Industrial Research of Iran, NO.2454).

اکسیداسیون چربی‌های غیراشباع به‌واسطه رادیکال‌های آزاد یکی از دلایل اصلی کاهش کیفیت مواد غذایی می‌باشد. حضور مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع نظیر اسید لینولئیک و اسید لینولنیک در چربی‌ها و روغن‌ها آن‌ها را بیشتر نسبت به اکسیداسیون حساس می سازد. این مشکل زمانی افزایش می‌یابد که روغن‌ها در معرض عواملی مثل اکسیژن، نور، دمای بالا یا فلزات مثل آهن و مس قرار می‌گیرند (Jabali, 2009). اکسیداسیون لیپیدها یک فرآیند پیچیده است که در آن لیپیدها، به‌خصوص اسیدهای چرب چندغیراشباعی، توسط تشکیل رادیکال‌های آزاد تجزیه شده و باعث تخریب طعم، آروما، بافت، رنگ،

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

(* - نویسنده مسئول: Email: alireza_rahman@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2020.40122.0

ارزش غذایی و کاهش زمان ماندگاری می‌گردد (Jacobsen, 1999). برخلاف بسیاری از غذاها، فساد در سس مایونز تنها به فساد حاصل از فعالیت‌های میکروبی محدود نمی‌شود، بلکه با توجه به ساختار و ترکیبات آن، می‌توان سه نوع فساد فیزیکی، شیمیایی و میکروبی را برای آن تعریف کرد؛ چون در فرایند تولید سس مایونز از دما برای سالم‌سازی فراورده استفاده نمی‌شود، لازم است به‌وسیله ترکیبات شیمیایی نگهدارنده مانند بنزوئیک اسید و نمک‌های آن از رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط نگهداری سس ممانعت شود. باتوجه به اینکه مصرف این ترکیبات (بنزوات) در عین فوائد ذکر شده مضراتی را برای سلامتی انسان نیز به دنبال دارند؛ بنابراین بایستی سعی شود که از این ترکیبات در میزان حداقل استفاده شود (Zabetiyan hoseini *et al.*, 2011). امروزه مصرف‌کنندگان مواد غذایی روز به‌روز تمایل بیشتری نسبت به مصرف غذاهایی که عاری از مواد شیمیایی هستند و در آن‌ها مواد طبیعی به‌کار رفته است از خود نشان می‌دهند و به همین دلیل اخیراً مطالعات زیادی بر روی امکان جایگزین کردن ترکیبات طبیعی به‌جای نگهدارنده‌های شیمیایی در غذاهای مختلف صورت گرفته است. به دلیل اثرات جانبی داروهای شیمیایی امروزه توجه به گیاهان دارویی رو به افزایش می‌باشد، همچنین عدم آلودگی محیط زیست از عوامل مهم استفاده از گیاهان دارویی به جای مواد شیمیایی است. به دلیل خواص ضدرادیکالی، آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و خواص مفید درمانی دیگر کشف شده در گیاهان دارویی و کوهی، اخیراً تحقیقات کاربردی زیادی درباره استفاده از این گیاهان و ترکیبات عصاره آن‌ها در درمان بیماری‌های مختلف و در رژیم غذایی روزانه مردم انجام شده است (Michael Davidson et al.,2012).

ترکیبات شیمیایی که می‌توانند شروع اکسایش را به تأخیر بیاندازند یا سرعت آن را در سیستم‌های غذایی کاهش دهند، با نام آنتی‌اکسیدان یا پاداکسنده شناخته می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها، با تثبیت رادیکال‌های آزاد اثر می‌کنند. آن‌ها با افزودن برخی از اجزایشان به رادیکال‌های آزاد ، این ترکیبات سمی را تثبیت می‌کنند (Shariyat panahi *et al.*, 2013). آنتی اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیلن هیدروکسی آنیزول (BHT[1])، بوتیلن هیدروکسی تولوئن (BHA[2])، ترت بوتیلن هیدروکسی تولوئن(TBHQ[3]) و پروپیل گالات (PG[4]) به‌طور تجاری در دسترس هستند و به‌طور معمول مورد استفاده قرارمی‌گیرند، اما نگرانی‌هایی در مورد سمیت آن‌ها وجود داشته که باعث محدودیت استفاده از آن‌ها در صنعت غذایی شده است. لذا شناسایی آنتی‌اکسیدان‌ها از منابع طبیعی ضروری می‌باشد که از جمله آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاهان می‌باشند (Souza *et al.*, 2011).

ترکیبات فنلی یکی از گروه‌های شیمیایی زیست‌فعال می‌باشند که به‌طورگسترده در گیاهان وجود دارند و دارای عملکردهای زیستی متنوعی می‌باشند و جزء عناصر مهم در رژیم غذایی انسان هستند. گزارش شده است که پلی‌فنل‌های طبیعی دارای خواصی عالی به‌عنوان نگهدارنده‌های موادغذایی‌هستند (Ignat et al., 2011). تحقیقات نشان داده که فلاونوئیدها، غشای چربی را در برابر اکسیداسیون حفظ می کنند. نمونه‌های گیاهی یکی از بهترین منابع دارای ترکیبات فنلی و در نتیجه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی محسوب می‌شوند. این ترکیبات مفید (ترکیبات آنتی‌اکسیدان، پلی‌فنل و ...) به مواد غذایی وارد شده و خصوصیات تغذیه‌ای، حسی و زمان ماندگاری آن‌ها را افزایش می‌دهند (Anwar *et al.*, 2003; Amic *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005).

سماق با نام علمی *Rhus coriaria* L. از خانواده *Anacardiacea* که به‌طور عمومی با عنوان Sumac شناخته شده، گیاهی است که به‌صورت وحشی در مناطق وسیعی از جزایر قناری، در سواحل مدیترانه، ایران، افغانستان و به‌صورت بومی در مناطقی از جنوب شرقی ترکیه رشد می‌کند. این گیاه محتوی فلاووس[5]، اسید فنولیک[6]، اسید سیتریک[7] و اسید تارتاریک[8] می‌باشد (Politeo and Jukis, 2007). سماق به علت دارا بودن ترکیب‌های فنولی قدرت آنتی‌اکسیدانی و نیز خاصیت ضدمیکروبی دارد. سماق، یکی از ده آنتی‌اکسیدان برتر گیاهی و یکی از ۳۵ گونه گیاه گل داری است که بیشتر در مناطق نیمه گرمسیری و معتدل می‌روید (Oliveira *et al.*, 2008).

فسفاتیدیل اتانول آمین نوعی فسفولیپید در غشای سلول است که از استری شدن فسفاتیدیک اسید با یک عامل آمینوالکل به نام اتانول آمین به وجود می‌آید. روغن‌های گیاهی دارای مقادیر کمی فسفاتید یا فسفولیپید می‌باشند. مقدار این ماده در روغن سویا نسبت به سایر روغن ها بیشتر بوده و ممکن است حتی به ۴/۵ درصد برسد. در فرایند تولید صنعتی روغن‌ها، فسفاتیدها به منزله ماده زیان‌آور عمل کرده و وجود آن‌ها در روغنی که برای مصرف به بازار عرضه می‌شود نیز مسأله ساز است. این در حالی است که اگر این اجزاء به شکل مناسبی در طی فرایند تولید روغن جدا شوند، دارای کاربردهای ارزشمندی نظیر ایفای نقش امولسیفایری در بسیاری از محصولات و سیستم‌های غذایی می باشند (Aslanzadeh *et al.*, 2013). اطلاعات و نظریه‌های موجود درباره خصوصیات فسفولیپیدها در ارتباط با اکسیداسیون روغن‌ها و

1 Butylated hydroxytoluene
2 Butylated hydroxyanisole
3 Tert-Butyl hydroquinone
4 Propyl Gallate
5 Flavus
6 Phenolic acid
7 Citric acid
8 Tartaric Acid

چربی‌ها پیچیده است. در این میان مدارک خوبی به‌واسطه آزمایشات انجام شده بر روی بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های اولیه و حداقل چندین فسفولیپید به‌دست آمده که این مدارک نشان‌دهنده فعالیت تشدیدکنندگی در فسفولیپیدها است (Zhu *et al*., 2013).

امواج صوتی ساده‌ترین و گسترده‌ترین روش برای شکستن سلول های ماده و استخراج عصاره‌های آن‌ها می‌باشد. امواج اولتراسونیک یا مافوق صوت، امواج صوتی با فرکانس‌های بالاتر از ۱۶ KHz هستند و این امواج توسط گوش انسان قابل تشخیص نمی‌باشند. این روش ایمن و قابل اعتماد است. در فرآیند استخراج عواملی چون نوع حلال، دما، زمان و نحوه عمل استخراج بسیار مهم هستند. هنگام برخورد امواج با یک ماده، این امواج نیرویی را اعمال می‌کنند، اگر نیرو بر سطح عمود باشد، به‌عنوان موج فشاری از درون غذا عبور می‌نماید و در صورتی که نیرو موازی سطح باشد موج برشی می‌گردد، که این نیروی برشی دیواره‌های سلول را به‌طور مکانیکی شکافته و انتقال جرم را بهبود می-بخشد. این اثر در استخراج ترکیبات مایع از سلول‌های جامد (استخراج جامد- مایع) استفاده می‌شود. کاهش اندازه ذرات توسط این روش سطح تماس بین جامد و مایع را افزایش داده و در نتیجه سرعت استخراج را افزایش می‌دهد. امواج اولتراسونیک باعث یک سری تغییرات ناگهانی در فشار و دما می‌شوند که باعث تجزیه بافت، ایجاد حباب‌های هوا در غذاهای مایع، نازک کردن غشاء سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد می-گردند که این عمل اثر کشنده‌ای روی میکروارگانیسم‌ها دارد. عمل تجزیه بافت و متلاشی کردن آن و همچنین نازک کردن غشاء سلولی باعث شده است تا این امواج در استخراج نیز بهره گرفته شود. با استفاده از این روش می‌توان با کاهش چشمگیری زمان به راندمانی مشابه استخراج با حلال دست یافت. در ضمن گزارش شده است که اشعه آن ممکن است باعث تجزیه ترکیبات آلی فسفردار گردد. استفاده از امواج اولتراسونیک بازده را بهبود می‌دهد و زمان لازم برای استخراج را کاهش می‌دهد (Ghalavand and moidina, 2014).

امروزه در صنایع غذایی به‌دنبال روش‌هایی هستند که از اکسیداسیون در روغن‌ها و مواد غذایی حاوی آن جلوگیری کنند. در واقع باید روش‌هایی را به‌کار برد که مانع از پیوند بین اکسیژن و پیوندهای دوگانه موجود شود (Sarmadina, 2015). با استناد به مطالب فوق و نیز عدم انجام پژوهش در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی موجود در سماق و نیز بررسی اثر سینرژیستی فسفاتیدیل اتانول آمین با آن، این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده از عصاره این گیاه به‌عنوان نگهدارنده باشد و در نهایت هم به شناخته شدن این گیاه کمک کرده و هم راه را برای تحقیقات آینده هموار سازد و نیز گامی درجهت بهداشت و اعتلای ایمنی غذایی جامعه برداشته شود.

مواد و روش‌ها

گیاه سماق که در اوایل پاییز برداشت می‌شود ازمؤسسه تحقیقاتی کرج تهیه شد. همچنین فسفاتیدیل اتانول آمین نیز از شرکت سیگما (ایران) خریداری شد.

تهیه عصاره سماق

گیاه سماق تحت شرایط طبیعی محیطی و با استفاده از جریان هوا در سایه خشک و با استفاده از دستگاه آسیاب (Moulinex MC 300132، فرانسه)، پودر شده و از مش ۴۰ عبور داده شد. سپس ۲۵ گرم از پودر گیاه سماق با نسبت ۱:۱۰ اتانول۷۰ درصد اضافه و سه روز متوالی مرحله خیساندن و سپس صاف کردن به طول انجامید. در ادامه عصاره تحت تأثیر امواج اولتراسونیک (M.P.I ،AMMM، سوئیس) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت تا مراحل استخراج کامل شود. در نهایت عصاره حاصل زیر هود قرار داده شد و پس از تبخیر حلال، مورد استفاده قرار گرفت (Rabiei *et al*., 2013).

آماده‌سازی نمونه‌های سس مایونز

برای تولید سس مایونز و مخلوط کردن مواد و تشکیل امولسیون در سطح آزمایشگاه، از مخلوط‌کن با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه استفاده شد. ابتدا مواد پودری شامل نمک، شکر، سیتریک اسید، صمغ، پودر خردل اضافه شد. سپس آب به مواد پودری اضافه شد. پس از آن تخم مرغ و بعد از آن روغن در نهایت سرکه اضافه شد و نمونه‌های سس مایونز مطابق با جدول ۱ کدبندی تیمارها تهیه و مورد بررسی قرار گرفت (Saberi and Mohammadifar, 2012).

محاسبه بازده استخراج عصاره

حلال موجود در عصاره توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان (Manometer, 550-B، انگلیس) در خلأ تبخیر شد. با محاسبه وزن اولیه بالن و وزن نهایی آن که حاوی عصاره بر جای مانده است، مقدار کل عصاره استخراج شده در مرحله استخراج محاسبه و به صورت درصد (گرم به صد گرم نمونه) بیان گردید (Shariyat, 1992).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک (فنل تام)

روش فولین سیوکالتو از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی می‌باشد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است. به‌طور خلاصه در این روش، ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره درون لوله آزمایش با ۱/۱۶۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرو لیتر معرف

فولین سیوکالتو مخلوط شدند. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات (۲۰ درصد وزنی/ حجمی) به محتوای لوله آزمایش افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب (MINA-TAJHIZ، ایران) با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Perkin Filmer, W1200، آمریکا) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد (Vermeulen *et al.*, 2006).

جدول ۱- تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق

Table 1- Treatments studied in this research

T_7	T_6	T_5	T_4	T_3	T_2	T_1	شاهد(T)	ترکیبات (درصد)Compounds (%)
63.26	63.26	63.26	63.26	63.26	63.26	63.26	63.26	روغن سویا Soy Oil
9	9	9	9	9	9	9	9	تخم‌مرغ Egg
3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	شکر Sugar
0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	صمغ گوار Guar gum
0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	صمغ گزانتان Xantan gum
1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	نمک طعام Salt
16.49	16.92	16.96	16.99	15.5	16	16.5	17	آب Water
5	5	5	5	5	5	5	5	سرکه Vinegar
0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	اسید سیتریک Citric acid
0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	خردل Mustard
0.5	0	0	0	1.5	1	0.5	0	عصاره سماق Extract sumac
0.01	0.08	0.04	0.01	0	0	0	0	فسفاتیدیل اتانول آمین phosphatidylethanolamine
0	0	0	0	0	0	0	0	سوربات پتاسیم Potassium sorbate
0	0	0	0	0	0	0	0	بنزوات سدیم Sodium benzoate
T_{15}	T_{14}	T_{13}	T_{12}	T_{11}	T_{10}	T_9	T_8	ترکیبات (درصد)Compounds (%)
63.26	63.26	63.26	63.26	63.26	63.26	63.26	63.26	روغن سویا Soy Oil
9	9	9	9	9	9	9	9	تخم‌مرغ Egg
3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	شکر Sugar
0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	صمغ گوار Guar gum
0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	صمغ گزانتان Xantan gum
1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	نمک طعام Salt
15.42	15.46	15.49	15.92	15.96	15.99	16.42	16.46	آب Water
5	5	5	5	5	5	5	5	سرکه Vinegar
0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	اسید سیتریک Citric acid
0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	خردل Mustard
1.5	1.5	1.5	1	1	1	0.5	0.5	عصاره سماق Extract sumac
0.08	0.04	0.01	0.08	0.04	0.01	0.08	0.04	فسفاتیدیل اتانول آمین phosphatidylethanolamine
0	0	0	0	0	0	0	0	سوربات پتاسیم Potassium sorbate
0	0	0	0	0	0	0	0	بنزوات سدیم Sodium benzoate

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای این آزمون، به ۵۰ میکرو لیتر از عصاره استخراجی، ۹۵۰ میکرولیتر محلول متانولی ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک در دمای اتاق قرار گرفت. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Perkin Filmer, W1200، آمریکا) در ۵۱۷ نانومتر در مقایسه با متانول به‌عنوان شاهد قرائت گردید. در نهایت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$DPPH= (A_{blank}- A_{sample}/ A_{blank}) \times 100 \quad (۱)$$

در این فرمول A_{blank} جذب نوری کنترل منفی را که فاقد عصاره می‌باشد نشان می دهد و A_{sample} میزان جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره بیان می‌کند ..(Dangelo *et al.*, 2007)

اندازه‌گیری عدد پراکسید

پراکسید می‌تواند ید موجود در یدید پتاسیم را آزاد کند به‌طوری که مقادیر آزاد شده را می‌توان به‌وسیله تیتراسیون با تیوسولفات سدیم اندازه گیری کرد و عدد پراکسید را بر حسب میلی‌اکی والان پراکسید در ۱۰۰ گرم روغن بیان نمود. این آزمون بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۹ (۲۰۱۴) انجام گرفت (Institute of Standards and Industrial Research of Iran, NO.4179).

اندازه‌گیری عدد اسیدی

این آزمون بر اساس روش استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۸ (۲۰۱۱) انجام گرفت. بدین منظور از میلی گرم پتاس مورد نیاز جهت خنثی کردن اسیدهای چرب آزاد موجود در یک گرم نمونه آزمایش برای به‌دست آوردن عدد اسیدی استفاده شد (Institute of Standards and Industrial Research of Iran, NO.4178).

اندازه‌گیری اندیس توتوکس

اندیس توتوکس نیز معیاری از اکسایش کل است که شامل فراورده‌های اولیه و ثانویه اکسایش می‌باشد. این اندیس مطابق استاندارد ملی ایران به شماره (۲۰۰۷) و بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Institute of Standards and Industrial Research of Iran, NO.4093).

اندیس توتوکس= (عدد پراکسید×۲)+عدد آنیزیدین (۲)

ارزیابی حسی

مطابق روش مقیاس ۵ نقطه‌ای هدونیک، ۱۴ نفر ارزیاب آموزش دیده ارزیابی شد. ویژگی های امتیازدهی ۴-صفر (صفر= غیرقابل مصرف، ۱= غیرقابل قبول، ۲= قابل قبول، ۳= رضایت‌بخش، ۴= عالی) بود. برای شستشوی دهان بین هر یک از نمونه‌ها و به‌منظور قضاوت بهینه، یک لیوان آب نیز در کنار نمونه‌ها قرار داده شد. از ارزیاب‌های آموزش دیده خواسته شد تا با در نظر گرفتن کیفیت تام، تیمارهای چهارگانه سس مایونز را در رتبه‌های صفر تا چهار قرار دادند. به‌طوری که به بهترین نمونه از نظر کیفیت رتبه چهار و به نازل‌ترین کیفیت رتبه صفر دهند. این ارزیابی در روزهای صفرم، ماه اول، دوم و سوم نگهداری انجام شد .پس از امتیازدهی ارزیاب‌ها به هر یک از خصوصیات کیفی مورد آزمایش، نتایج مربوط به هر یک از نمونه‌ها از طریق طرح بلوک های کاملاً تصادفی ارزیابی گردید (Ghazi zadeh and Razaghi., 1998).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

میانگین هر پارامتر، توسط طرح آنالیز واریانس (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. تفاوت‌های بین تیمارها، در آزمون دانکن چندگانه، در سطح ۹۵ در صد ($p<0.05$) بیان گردید.

نتایج و بحث

ارزیابی بازده استخراج، میزان فنل تام و قدرت مهارکنندگی رادیکال های آزاد عصاره سماق

نتایج ارزیابی میزان شاخص‌های بازده استخراج، میزان فنول تام و همچنین قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی نتایج میزان استخراج عصاره، میزان فنل تام و همچنین میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره رابطه مستقیم و معنی داری با نوع روش عصاره¬گیری اعم از روش آبی یا الکلی و همچنین سایر روش¬های نوین مورد استفاده دارد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق با روش¬های مشابه و نظیر تشابه زیادی نشان داده و مطابقت داشت. در این راستا تحقیقات مشابهی وجود دارد.

در این روش استخراج عصاره به روش اتانولی و به همراهی با روش اولتراسونیک صورت پذیرفت. نتایج میزان ترکیبات فنولی تام عصاره سماق در تحقیق فوق (۱۹/۶۲ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره) با مقادیر ترکیبات فنولی تام به‌دست آمده از تحقیقات Abdolrezaei و همکاران (۲۰۱۶) توافق بود. آنها در بررسی ترکیبات فلاونوئیدی حاصل از عصاره گیاه سماق میزان ترکیبات فنولی را ۱۹/۶ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش نمودند. همچنین یافته‌های آنها نشان داد عصاره سماق به دلیل دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی تأثیر مثبتی بر کاهش میزان اکسیداسیون LDL دارد. اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالا می‌باشد که در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزایش غلظت ترکیبات فنلی به‌طور مستقیم میـزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. توانایی مهارکنندگی فنل‌ها به دلیل گروه‌های هیدروکسیل (OH- وگروه‌های قابل تعویض

متوکسی (OCH3–) در مولکول‌ها است (Ajila and Rao., 2013). Young Kil و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره سماق، Shukla و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تاثیر پوشش‌های خوراکی حاوی عصاره سماق بر افزایش زمان نگهداری توت‌فرنگی، گزارش کردند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH ترکیبات گیاهی به غلظت بستگی دارد و با افزایش غلظت، اثر مهارکنندگی شدت می‌یابد. ترکیبات عصاره سماق از جمله تانن و آنتوسیانیدین‌ها توانایی دادن الکترون‌ها به رادیکال‌های آزاد فعال را دارند و در نتیجه واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد را متوقف می‌کنند. این محققان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی ترکیبات گیاهی را با میزان بالای فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره‌ها مرتبط دانستند. در بین ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری محسوب می‌شوند. فلاونوئیدها بازدارنده‌های قوی رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هستند و تأثیر آن‌ها بر رادیکال‌های سوپر اکسید هنوز مشخص نشده است. این ترکیبات می‌توانند حتی زمانی که با یون‌های فلزی کمپلکس تشکیل می‌دهند، بر رادیکال‌های آزاد اثر بگذارند. وجود گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت‌های ۳ و ۵ و گروه‌های اورتودی فنل در ساختار فلاونوئیدها بـه آن‌ها امکان مهار رادیکال‌های آزاد را می‌دهد و افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل با قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی رابطه مسـتقیم دارد (Ajila and Rao., 2013).

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های بازده استخراج، میزان فنول تام و قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره سماق

Table 2- Comparison of average extraction efficiency indices, total phenol content and free radical scavenging power of Sumac extract

Inhibitory power (free radicals (Mmol/100 g of sumac extrac)) قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (میلی‌مول/۱۰۰ گرم عصاره سماق)	Total phenol content (Mg quercetin per gram) میزان فنل تام (میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره)	Extraction efficiency بازده استخراج
77± 0.01	19.627± 0.359	48.54± 0.02

ارزیابی میزان پراکسید

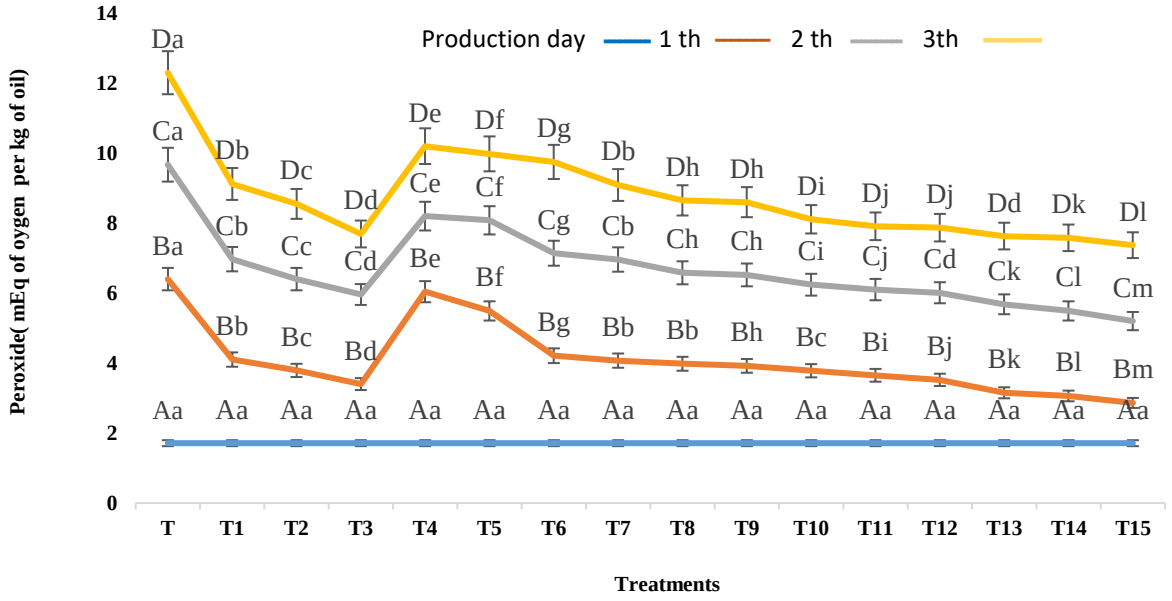
با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که تاثیر تیمار، زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری در میزان شاخص پراکسید تیمارهای سس مایونز معنی دار بود ($p\leq$۰/۰۵) و افزودن عصاره سماق و فسفاتیدیل موجب کاهش معنی‌دار میزان اندیس پراکسید در مقایسه با نمونه شاهد گردید. تغییرات میانگین مقادیر اندیس پراکسید نمونه‌های مختلف سس مایونز طی زمان نگهداری سه ماهه، در شکل ۱ آورده شده است.

با توجه به نمودار، اختلافات معنی‌داری بین میانگین میزان شاخص عدد پراکسید تیمارهای سس مایونز بر اساس اختلاف در شاخص تیمار و بر اساس زمان نگهداری سه ماه وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). همچنین در مقدار شاخص پراکسید روند افزایشی معنی‌داری با توجه به میزان شاخص زمان نگهداری تیمارهای سس مایونز در طی سه ماه نگهداری دیده شد ($p\leq$۰/۰۵)، به‌طوری که کمترین میزان شاخص پراکسید تیمارهای سس مایونز به روز تولید و بالاترین آن نیز به ماه سوم نگهداری تعلق داشت ($p\leq$۰/۰۵). اما با افزودن عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین به‌صورت تکی و ترکیبی در میزان شاخص عدد پراکسید تیمارهای سس مایونز در طی سه ماه نگهداری، تغییراتی ایجاد شد به طوری که میزان پراکسید در تیمار شاهد (فاقد عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین) در انتهای ماه سوم، در بالاترین میزان ممکن و کمترین میزان عدد پراکسید در انتهای ماه اول نگهداری به تیمار سس مایونز داری ۱/۵ درصد عصاره سماق و ۰/۰۸ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین (T_{15}) تعلق داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان استفاده از عصاره سماق و همچنین فسفاتیدیل اتانول آمین همان گونه که در تیمارهای T_1 تا T_3 و همچنین تیمارهای T_4 تا T_6 مشاهده می‌شود، میزان شاخص عدد پراکسید به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بوده و مقدار شاخص پراکسید در نمونه‌های حاوی عصاره سماق، کمتر از نمونه‌های حاوی فسفاتیدیل اتانول آمین بود ($p\leq$۰/۰۵). همچنین با افزایش میزان استفاده از عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین در هر یک از غلظت‌های تکی و ترکیبی میزان شاخص پراکسید به میزان معنی داری کاهش یافت. ($p\leq$۰/۰۵).

سس مایونز معمولی دارای دو فاز آبی و روغنی می‌باشد و این سطح به لحاظ اکسایش پیچیده‌تر از روغن ساده می‌باشد. عوامل مختلفی مانند نور، یون‌های فلزی و اکسیژن قادر به بالا بردن اندیس پراکسید می‌باشند. به طوری که افزایش عدد پراکسید باعث کاهش پایداری اکسیداتیو می‌شود. شاخص پراکسید یکی از پرکاربردترین شاخص‌های کیفی است که مقدار کل پراکسیدهای موجود در روغن را به‌عنوان فراورده‌های اولیه حاصل از اکسایش نشان می‌دهد. کاهش عدد پراکسید پس از رسیدن به حد بیشینه آن طی مراحل ابتدایی اکسایش

گزارش شده است که بیانگر ناپایدار بودن پراکسیدها و شکست آن‌ها به فراورده‌های ثانویه طی مراحل بعدی است (Shahin *et al*., 2013).

آنتی‌اکسیدان‌ها از عوامل اصلی خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند. لذا تأمین ذخایر آنتی‌اکسیدان، به‌منظور کاهش آثار تنش اکسایشی امری مهم تلقی می‌شود. با افزایش عدد پراکسید سرعت تبدیل هیدروپراکسیدها به محصولات ثانویه (آلدئیدها، کتون‌ها و...) افزایش یافته و نیز سرعت تشکیل محصولات سوم اکسیداسیون و متعاقب آن تجزیه این محصولات افزایش یافته و در نتیجه پایداری اکسیداسیون سس مایونز کاهش می‌یابد (Fatemi, 2013).



شکل ۱- مقایسه میانگین شاخص پراکسید تیمارهای سس مایونز بر اساس اثرات متقابل تیمار* زمان نگهداری

حروف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف بین روزهای نگهداری در سطح اطمینان ۵ درصد است.

حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها در سطح اطمینان ۵ درصد است.

Fig. 1. Comparison of average peroxide index of mayonnaise treatments based on treatment interactions * holding time.

Capital letters indicate the difference between the holding days at the 5% confidence level.

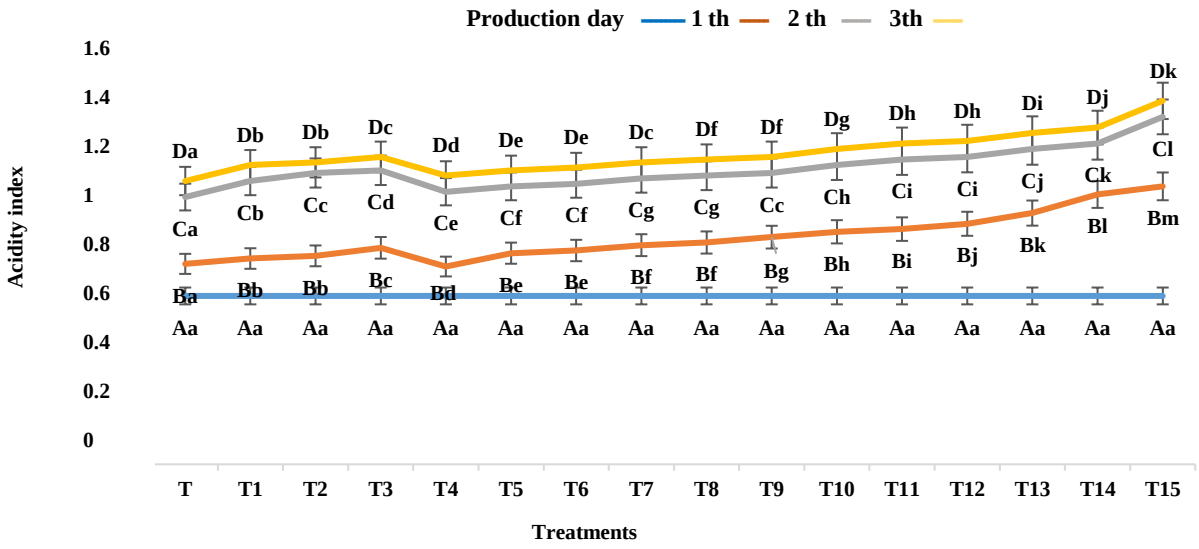
The lowercase letters indicate the difference between the treatments at the 5% confidence level.

فسفولیپیدها گروهی از ترکیبات سینرژیستی هستند که جزء آنتی اکسیدان‌ها ممانعتی طبقه بندی می‌شوند. نتایج ارزیابی عدد پراکسید نشان داد که استفاده از فسفاتیدیل اتانول آمین در فرمولاسیون سس مایونز و همچنین افزایش میزان غلظت استفاده از آن میزان شاخص پراکسید سس مایونز را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که احتمال می‌رود که فسفولیپیدها با هیدروپراکسیدهای لیپیدی واکنش داده و آن را از طریق مکانیسم‌های غیررادیکالی تخریب کرده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در چربی افزایش می‌دهند. از این رو فسفولیپیدها در به تأخیر انداختن واکنش‌های اتواکسیداسیون تأثیرات مثبتی دارند (Elhamirad and Haddad khodaparast, 2009). تمامی فسفولیپیدهای حاوی گروه آمین از این طریق عمل می‌کنند. در واقع فسفولیپیدها با هیدروپراکسیدها واکنش داده و از طریق یک مکانیسم برشی تولید یکی از مشتقات نیتروکسیل به نام تری متیل آمین اکسید می‌نمایند. فرآورده های ناشی از واکنش غیررادیکالی فسفاتیدیل اتانول آمین با هیدروپراکسیدها، ایمین نامیده می‌شود. یک مکانیسم دیگر در رابطه با اثر آنتی‌اکسیدانی فسفولیپیدها جذب کردن یون‌های فلزی می‌باشدکه از طریق ایجاد کمپلکس با یون‌های فلزی تولید نمک‌های غیریونیزه می‌نمایند (Jewell and Nawar, 2000; Pokorny *et al*., 2001)، به این جهت با افزایش میزان استفاده از فسفاتیدیل اتانول آمین میزان شاخص پراکسید تیمارهای سس مایونز به‌طور معنی‌داری کاهش می یابد (Zhu *et al*., 2013). در تیمارهای سس مایونز با افزایش میزان عصاره سماق به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره در ممانعت از رشد ترکیبات ثانویه و گسترش اکسیداسیون میزان شاخص پراکسید به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در تلفیق آن با فسفاتیدیل اتانول آمین نیز به صورت ترکیبی با افزایش میزان فسفاتیدیل اتانول آمین و عصاره سماق میزان شاخص پراکسید به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که به اثرات

سینرژیستی عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین گردید. در این راستا Majdar Langerodi و Tajik (۲۰۱۶) در بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره سماق با پوشش خوراکی کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی بر گوشت قرمز در بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده و معمولی نیز دریافتند که افزایش میزان استفاده از عصاره سماق به‌طور معنی داری شاخص پراکسید تیمارهای گوشت قرمز را کاهش داد که با نتایج تحقیق حاضر هم راستا می‌باشد. Abbasifar و همکاران (۲۰۰۹) اثر اسانس عصاره سماق و استارتر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* را در طول مدت تهیه، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی ارزیابی و مشاهده کردند که عصاره سماق میزان شاخص پراکسید را در طی دوره نگهداری کاهش می‌دهد که با نتایج تحقیق حاضر نیز همخوانی داشت (Abbasifar *et al*., 2009).

ارزیابی میزان اسیدیته

تغییرات میانگین مقادیر اسیدیته نمونه‌های مختلف سس مایونز طی زمان نگهداری سه ماهه، در شکل ۲ آورده شده است. نمودار نشان می‌دهد که اختلافات معنی‌داری بین میانگین میزان شاخص اسیدیته تیمارهای سس مایونز بر اساس اختلاف در شاخص تیمار و بر اساس زمان نگهداری سه ماهه وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). در مقدار شاخص اسیدیته روند افزایشی معنی‌داری با توجه به میزان شاخص زمان نگهداری تیمارهای سس مایونز در طی سه ماه نگهداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). اما افزودن عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین به‌صورت تکی و ترکیبی در میزان شاخص عدد اسیدیته تیمارهای سس مایونز در طی سه ماه نگهداری تغییراتی ایجاد نمود. افزودن عصاره سماق باعث افزایش اسیدیته می‌شود اما در طی زمان نگهداری در تیمارهایی با میزان بالای سماق به میزان ۱/۵ درصد تغییرات اسیدیته کمتر از تیمار سس مایونز با مقادیر ۰/۵ درصد بود. همچنین در طی زمان نگهداری میزان تغییرات شاخص اسیدیته تیمار با ۰/۸ در صد فسفاتیدیل اتانول آمین کمتر از تیمار ۰/۱ در صد فسفاتیدیل اتانول آمین می‌باشد. در تیمارهای ترکیبی عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین مقدار اسیدیته به میزان کمتر افزایش می‌یابد.



شکل ۲- مقایسه میانگین شاخص اسیدیته تیمارهای سس مایونز بر اساس اثرات متقابل تیمار* زمان نگهداری

حروف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف بین روزهای نگهداری در سطح اطمینان ۵ درصد است.

حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها در سطح اطمینان ۵ درصد است.

Fig. 2. Comparison of the average acidity index of mayonnaise treatments based on the interaction effects of the treatment *holding time

Capital letters indicate the difference between the storage days at the 5% confidence level.

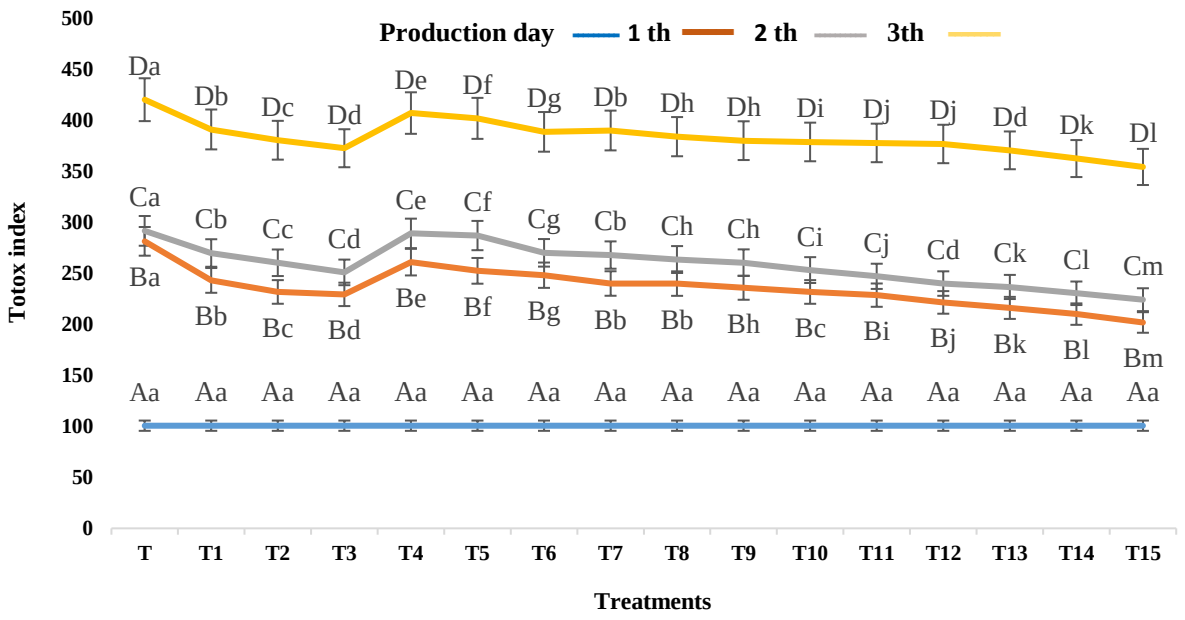
The lowercase letters indicate the difference between the treatments at the 5% confidence level.

نتایج پژوهش نشان داد که اختلافات معنی‌داری بین میزان شاخص اسیدیته تیمارهای سس مایونز بر اساس اختلاف در میزان عصاره سماق مشاهده شد ($p\leq$۰/۰۵). بررسی نتایج نشان داد که استفاده از عصاره سماق اثرات معنی‌داری بر میزان اسیدیته تیمارهای سس مایونز داشته و افزایش میزان عصاره سماق می‌تواند خود باعث افزایش میزان اسیدیته تیمارهای سس مایونز شود (Institute of standards and Industrial Research of Iran, NO.2454). در سس مایونز اسیدیته کل نباید از ۰/۶ برحسب گرم درصد اسید استیک، کمتر باشد (Institute of standards and Industrial Research of Iran, NO.2454). اگر اسیدیته سس از ۱/۵ درصد بیشتر باشد، سس سالاد حاصل طعمی نامطلوب پیدا می‌کند و اگر کمتر از ۰/۶ درصد باشد نیز زمینه برای رشد میکرواورگانیسم‌ها و فساد فراهم می‌شود، به‌نحوی که اسیدیته بهینه را ۱/۲ –۰/۷ درصد ذکر کرده‌اند (Rahbari *et al.*, 2012). طبق نتایج به‌دست آمده، میزان اسیدیته در نمونه‌های حاوی ۱/۵ درصد عصاره سماق و ۰/۰۸ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین، در ماه‌های دوم و سوم نگهداری، خارج از استاندارد بود.

افزایش اسیدیته موجود احتمالا به مقدار بسیار کمی نشأت گرفته از بار میکروبی ناشی از عصاره حاصل پودر سماق بوده و خارج شدن عوامل اسیدی ناشی از عصاره سماق در طی زمان نگهداری بوده است که با افزایش میزان عصاره مورد استفاده از سماق در فرمولاسیون سس مایونز به میزان بالا باعث افزایش میزان اسیدیته تیمارهای سس مایونز می‌شود. با توجه به بالا بودن میزان روغن در سس مایونز تغییرات معنی داری در میزان اسیدیته روغن‌ها مشاهده می‌شود. به‌طور کلی روغن‌ها در اثر عوامل مختلفی از جمله گرما و آلودگی به مرور زمان دستخوش تغییرات کیفی شده که عدد اسیدی بیانگر یکی از شاخص‌های این تغییرات می‌باشد. بررسی نتایج ارزیابی عدد اسیدی حاکی از افزایش معنی‌دار عدد اسیدی سس مایونز در طی زمان نگهداری بود. دلایل متعددی برای این تغییرات وجود داشت. این امر احتمالا به‌دلیل تبدیل ترکیبات ثانویه اکسایش به اسیدهای کربوکسیلیک می‌باشد. بخشی از اسیدیته تیمارها در طی زمان نگهداری نیز به دلیل فساد میکروبی ناشی از فعالیت باکتری‌ها و افزایش فلور میکروبی و همچنین اسیدیته ناشی از ترکیبات ثانویه ناشی از تخمیر باکتری‌ها صورت پذیرفت. در این راستا استفاده از آنتی‌اکسیدان سنتزی و همچنین ترکیبات عصاره سماق به دلیل داشتن ترکیبات پلی‌فنلی با مهار کردن فرآیند واکنش‌های اکسایش می‌تواند از افزایش و تجمع اسیدهای ترکیبات اسیدهای کربوکسیلیک و از افزایش اسیدیته در طی دوره نگهداری ممانعت نماید. از طرف دیگر نیز فسفاتیدیل اتانول آمین با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی قادر به جلوگیری از افزایش اندیس اسیدی در سس مایونز گردد (Jewell and Nawar, 2000; Pokorny *et al.*, 2001). در واقع فسفاتیدیل اتانول آمین رادیکال‌های آزاد را تخریب می‌کند و موجب به تأخیر انداختن واکنش‌های اتواکسیداسیون می‌گردد (Elhamirad and Haddad Khodaparast, 2009). از طرف دیگر عصاره سماق دارای مقادیر متفاوتی از متابولیت‌های گیاهی شامل ترکیبات فنولی و آنتوسیانین می‌باشد که دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشند، مکانیسم عمل ترکیبات فنولی شامل اختلال در غشای سیتوپلاسمی، برهم‌زدن نیروی محرکه پروتونی و جریان الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی است (Burt, 2004). بررسی نتایج ارزیابی میزان اسیدیته نشان داد که عصاره سماق در روز تولید در فرمولاسیون باعث افزایش اسیدیته تیمارها می‌شود. عصاره سماق با ممانعت از رشد میکروبی و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر از فعالیت هیدرولتیکی چربی و تغییرات اسیدیته حین نگهداری ممانعت می‌کند. وجود فسفاتیدل اتانول آمین به‌لحاظ ساختاری در فرمولاسیون سس مایونز اختلافات معنی داری ایجاد نمی‌نماید. در تیمارهای ترکیبی فسفاتیدل اتانول آمین و عصاره سماق میزان اسیدیته تیمارها به میزان کمتری افزایش می‌یابد که به اثرات سینرژیستی آن‌ها در مهار اکسیداسیون و کاهش فعالیت میکروبی در تیمارهای سس مایونز بر می‌گردد. soltani Rohanian و Sharifi (۲۰۱۵) اثرات عصاره آبی سماق بر روی خصوصیات میکروبی، حسی و زمان ماندگاری همبرگر بررسی نمودند. آن‌ها نیز دریافتند که عصاره آبی سماق در طی زمان نگهداری از میزان اتواکسیداسیون چربی و افزایش اسیدیته در طی زمان نگهداری می‌کاهد به عبارتی باعث مهار افزایش اسیدیته تیمارهای همبرگر می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر هم‌راستا بود (Rohanian and Sharifi soltani., 2015). همچنین Jafari Khatayloo و Almasi (۲۰۱۷)، با بررسی تأثیر اسانس نعناع فلفلی و بنزوات سدیم بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبی، حسی و رئولوژیکی سس مایونز بیان داشتند که با افزایش میزان درصد اسانس نعناع فلفلی و نیز افزایش زمان، میزان اسیدیته در نمونه‌ها افزایش یافت که علت آن می‌تواند شکسته شدن برخی از گروه های استری و تبدیل آن‌ها به گروه‌های اسیدی مربوط باشد. همچنین رشد باکتری‌های غیربیماری‌زای مقاوم به اسید نظیر لاکتوباسیلوس‌ها نیز ممکن است در این امر مؤثر باشد (Jafari Khatayloo and Almasi., 2017).

اندیس توتوکس

نتایج شکل ۳ تغییرات میانگین مقادیر اندیس توتوکس نمونه‌های مختلف سس مایونز را طی سه ماه نگهداری، نشان می‌دهد. طبق نتایج به دست آمده اختلافات معنی‌داری بین میانگین میزان شاخص توتوکس تیمارهای سس مایونز و نیز بین روزهای نگهداری یک تیمار، وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵).



شکل ۳- مقایسه میانگین شاخص توتوکس تیمارهای سس مایونز بر اساس اثرات متقابل تیمار* زمان نگهداری

حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف بین روزهای نگهداری در سطح اطمینان ۵ درصد است.

حروف کوچک نشان دهنده اختلاف بین تیمارها در سطح اطمینان ۵ درصد است.

Fig. 3. Comparison of the average Tutox index of mayonnaise treatments based on the interaction effects of the treatment * holding time.

Capital letters indicate the difference between the storage days at the 5% confidence level.

The lowercase letters indicate the difference between the treatments at the 5% confidence level.

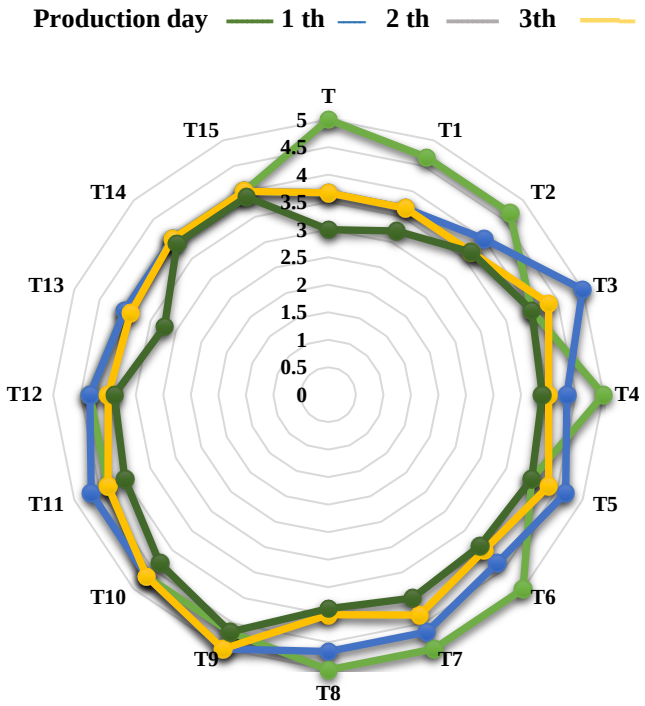
زمان نگهداری تاثیرات معنی‌داری بر میزان شاخص توتوکس تیمارهای سس مایونز نشان داد (p≤۰/۰۵). به‌طور کلی روند افزایشی معنی‌داری در میزان شاخص توتوکس کلیه تیمارهای سس مایونز در طی زمان نگهداری مشاهده شد به‌طوری که بالاترین میزان شاخص توتوکس در کلیه تیمارها به ماه سوم نگهداری سس مایونز و کمترین میزان شاخص توتوکس به روز تولید سس مایونز تعلق داشت (p≤۰/۰۵). با افزایش میزان استفاده از عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین میزان شاخص توتوکس تیمارهای سس مایونز به میزان کمتری افزایش یافت (p≤۰/۰۵). کمترین میزان تغییرات شاخص توتوکس در انتهای ماه سوم مربوط تیمارهای عصاره سماق با غلظت ۱/۵ درصد و ۰/۰۸ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین می‌باشد و بالاترین مربوط به تیمار شاهد می‌باشد (p≤۰/۰۵). با افزایش میزان استفاده از عصاره سماق میزان شاخص توتوکس تیمارهای سس مایونز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت به‌طوری که در بین تیمارهای T_1 تا T_3، تیمار T_3 به میزان ۱/۵ درصد عصاره سماق دارای میزان شاخص توتوکس کمتری در مقایسه با تیمار شاهد و همچنین تیمار ۰/۵ درصد عصاره سماق بود (p≤۰/۰۵). در تیمارهای دارای فسفاتیدیل اتانول آمین با افزایش میزان فسفاتیدیل اتانول آمین، میزان شاخص توتوکس تیمارهای سس مایونز به‌طور معنی داری کاهش یافت (p≤۰/۰۵). به‌طوری که میزان شاخص توتوکس تیمارهای سس مایونز دارای ۰/۰۸ درصد در مقایسه با مقادیر ۰/۰۱ و ۰/۰۴ درصد به‌طور معنی داری کمتر می‌باشد (p≤۰/۰۵). بالاترین میزان نسبت فسفاتیدیل آمین و عصاره سماق (تیمار $T_{۱۵}$) دارای میزان شاخص توتوکس کمتری در مقایسه با تیمار شاهد و سایر تیمارهای دارای عصاره سماق و شاخص فسفاتیدیل اتانول آمین بود (p≤۰/۰۵). تیمار شاهد فاقد عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین دارای بالاترین میزان اندیس توتوکس بود (p≤۰/۰۵).

هیدروپراکسیدها محصولات اولیه اکسایش به‌شمار می‌آیند که ترکیباتی ناپایدار بوده و به عواملی همچون آلدئیدها، کتون‌ها شکسته می‌شوند. اندیس آنیزیدین روشی استاندارد برای ارزیابی محصولات ثانویه اکسیداسیون آلدئیدها و به‌ویژه آلدئیدهای α و β غیراشباع در روغن‌ها و چربی‌های گیاهی و حیوانی است کـه در نتیجه اکسایش اسیدهای بیانگر گسترش واکنش اکسایش خودبه‌خودی و افزایش محصولات ثانویه حاصل از تجزیه هیدروپراکسیدها و ترکیب‌های کربونیل‌دار با گذشت زمان است. به‌طور کلی اندیس توتوکس رابطه

مستقیم و معنی‌داری با اندیس آنیزیدین داشته و افزایش میزان اندیس آنیزیدین نیز میزان اندیس توتوکس را افزایش می‌دهد (Jewell and Nawar, 2000; Pokorny *et al.*, 2001). اندیس آنیزیدین نیز با شاخص پراکسید نیز رابطه مستقیم و معنی‌داری دارد و همان‌گونه که در نتایج ارزیابی شاخص پراکسید تیمارهای سس مایونز دیده شد، میزان شاخص پراکسید کلیه تیمارهای سس مایونز در طی زمان نگهداری نیز با افزایش معنی‌داری مواجه بود ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان استفاده از عصاره سماق و همچنین فسفاتیدیل اتاتول آمین میزان شاخص پراکسید تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد و همچنین تیمارهایی با مقادیر پایین‌تر عصاره و فسفاتیدیل اتانول آمین، کاهش معنی‌داری داشت که به جهت فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول امین بوده، فسفاتیدیل اتانول آمین با هیدروپراکسیدها واکنش داده و از طریق یک مکانیسم برشی تولید یکی از مشتقات نیتروکسیل به نام تری متیل آمین اکسید می‌نمایند و از این رو موجب کاهش میزان اکسیداسیون می‌گردد و در مکانیسم دیگر نیز با جذب کردن یون‌های فلزی و تولید نمک‌های غیریونیزه موجب کاهش اکسیداسیون می‌گردد (Jewell and Nawar, 2000; Pokorny *et al.*, 2001) و در نهایت میزان شاخص توتوکس تیمارهای سس مایونز نیز کاهش معنی داری را نشان داد ($p\leq$۰/۰۵). در این راستا نیز تحقیقات مشابهی وجود داشت. Majdar Langerodi و Tajik (۲۰۱۶) در بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره سماق با پوشش خوراکی کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی بر گوشت قرمز در بسته بندی اتمسفر اصلاح شده و معمولی نیز دریافتند که استفاده از عصاره سماق شاخص توتوکس تیمارهای گوشت قرمز را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت.

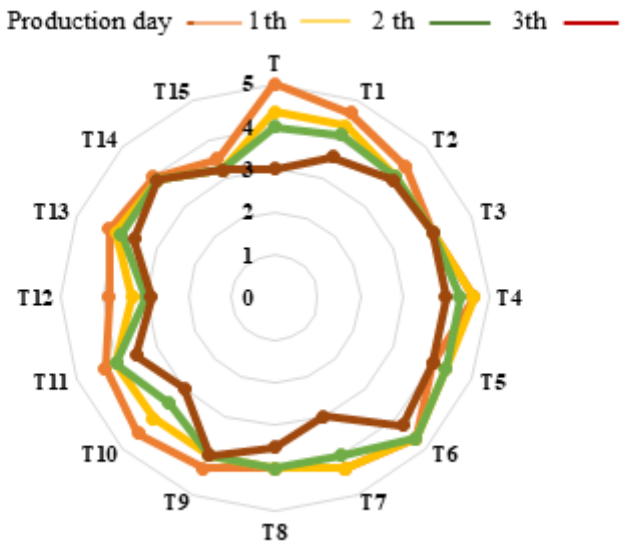
ارزیابی حسی

با توجه به نتایج به‌دست آمده مطابق با شکل‌های ۴ تا ۸ اختلافات معنی‌داری بین میزان امتیازات شاخص عطر و بو، رنگ، طعم و مزه و پذیرش کلی تیمارهای سس مایونز بر اساس تیمار در طی زمان نگداری سه ماه وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان عصاره سماق از نیم به یک و نیم درصد میزان شاخص عطر و بو، بافت، رنگ و طعم و پذیرش کلی تیمارهای سس مایونز کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵).



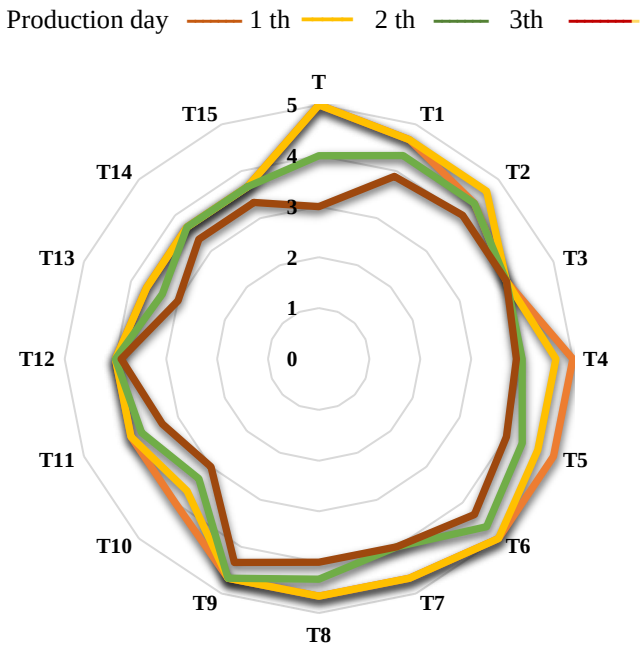
شکل ٤- مقایسه میانگین امتیازات شاخص عطر و بو تیمارهای سس مایونز بر اساس اثر متقابل تیمار*زمان نگهداری

Fig. 4. Comparison of average scent index scores of mayonnaise treatments based on the interaction of the treatment * holding time.



شکل ۵- مقایسه میانگین امتیازات شاخص بافت تیمارهای سس مایونز بر اساس اثر متقابل تیمار*زمان نگهداری

Fig. 5. Comparison of the average texture index scores of mayonnaise treatments based on the interaction of the treatment* holding time.



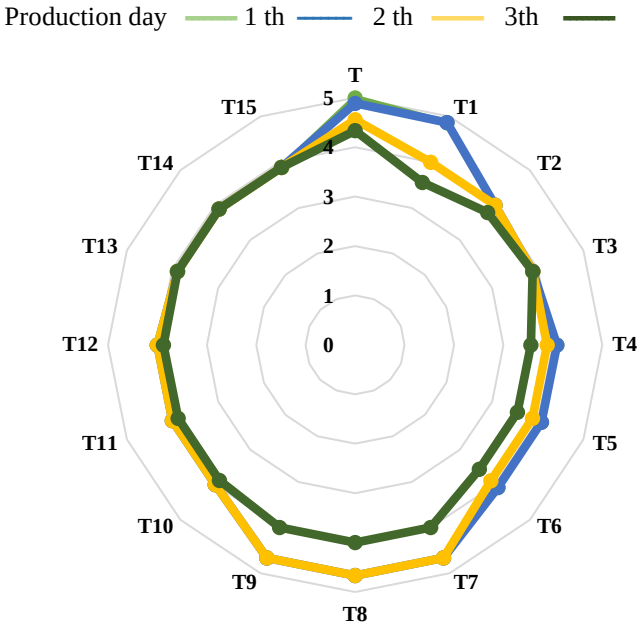
شکل ٦- مقایسه میانگین امتیازات شاخص طعم و مزه تیمارهای سس مایونز بر اساس اثر متقابل تیمار*زمان نگهداری

Fig. 6. Comparison of the average taste index scores of mayonnaise treatments based on the interaction of the treatment *holding time

استفاده از فسفاتیدیل اتانول آمین اثرات معنی‌داری بر روی میزان امتیازات عطر و بو، بافت، رنگ، طعم و مزه و پذیرش کلی نشان نداد.

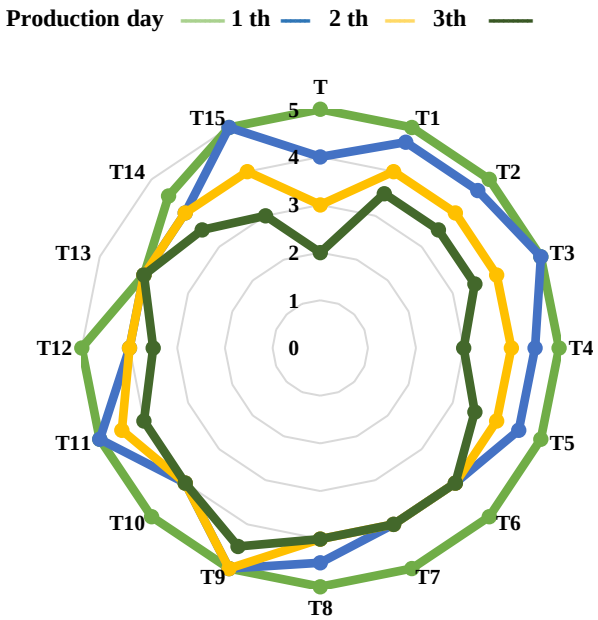
در طی زمان نگهداری میزان امتیازات عطر و بو، رنگ، طعم و مزه و پذیرش کلی در کلیه تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p≤۰/۰۵).

بررسی نتایج ارزیابی شاخص عطر و بو نشان داد که استفاده از عصاره سماق در مقادیر بالای استفاده دارای اثرات جانبی بر روی میزان عطر و بو در سماق می‌باشد. میزان این تغییرات عطر و بو در مقادیر ۰/۵ درصد عصاره سماق کمتر از مقادیر ۱ و ۱/۵ درصد عصاره سماق بوده اما در طی زمان نگهداری عصاره سماق از افزایش اسیدیته و کاهش افت عطر و بو محصول در طی نگهداری ممانعت می‌نماید.



شکل ۷- مقایسه میانگین امتیازات شاخص رنگ ظاهری تیمارهای سس مایونز بر اساس اثر متقابل تیمار*زمان نگهداری

Fig. 7. Comparison of the average color index scores of mayonnaise treatments based on the interaction of the treatment *holding time.



شکل ۸- مقایسه میانگین امتیازات شاخص پذیرش کلی تیمارهای سس مایونز بر اساس اثر متقابل تیمار* زمان نگهداری

Fig. 8. Comparison of the average scores of the general acceptance index of mayonnaise treatments based on the interaction effect of the treatment* holding time.

ترکیب فسفاتیدیل آمین دارای عطر و بوی مشخصی نبوده و استفاده از مقادیر مختلف فسفاتیدیل اتانول آمین بر روی خصوصیات عطر و بو محصول تأثیرات معنی‌داری ندارد اما در طی زمان نگهداری با ممانعت از اتو اکسیداسیون و تغییرات آنتی اکسیدانی سس مایونز از افت امتیازات عطر و بو در طی زمان نگهداری ممانعت نموده و نهایتاً با در نظر گرفتن خصوصیات سینرژیستی عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین، ترکیب ۰/۰۸ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین و یک درصد عصاره سماق دارای بالاترین میزان مطلوبیت از نظر خصوصیات عطر و بو در بین تیمارهای سس مایونز ارزیابی گردید. Janine Passos Lima da و همکاران (۲۰۱۲) اثرات روغن اسانسی پونه کوهی را بر *سالمونلا انتریدیس* در سس مایونز بررسی کرد. نتایج نشان داد که استفاده از عصاره پونه کوهی از تغییرات عطر و بو در طی زمان نگهداری ممانعت می‌کند که با نتایج تحقیق حاضر در توافق بود.

مقادیر بالای عصاره سماق به جهت دارا بودن غلظت بالایی از ترکیبات پلی‌فنلی می‌تواند باعث تغییرات نامطلوبی در پایداری امولسیونی و بافت سس مایونز گردد و توازن فاز چربی در چربی را به هم بزند. از این رو در مقادیر ۱/۵ درصد و سپس ۱ درصد عصاره سماق در فرمولاسیون سس مایونز امتیازات بافت تیمارهای سس مایونز به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵). استفاده از عصاره گیاهان در مواد غذایی به‌خصوص در سس مایونز با تغییرات طعم و مزه همراه می باشد بنابراین باید با احتیاط بیشتری مصرف شود. نتایج نشان داد که استفاده از عصاره سماق در مقادیر ۱ و ۱/۵ درصد باعث کاهش امتیازات طعم و مزه گردید اما در مقادیر ۰/۵ به همراه مقادیر ۰/۰۴ درصد و همچنین ۰/۰۸ درصد فسفاتیدل اتانول آمین به‌دلیل ممانعت از گسترش فساد میکروبی و هیدرولتیکی و تغییرات ناشی از افزایش اسیدیته و عدد پراکسید می‌تواند به حفظ خصوصیات طعم و مزه در طی نگهداری سس مایونز کمک نماید. Adeli Milani و همکاران (۲۰۱۰) اثر پودر خردل زرد برpH، جمعیت میکروبی زنده و خواص حسی سس مایونز بررسی نمودند. نتایج نشان داد که پودر خردل می تواند از تغییرات طعم و مزه در سس مایونز در طی نگهداری ممانعت نماید که با نتایج تحقیق حاضر در توافق می باشد. تغییرات رنگ اولیه در سس مایونز در روز تولید در مقادیر بالای عصاره سماق وجود داشته اما در مقادیر فسفاتیدیل اتانول آمین اختلافات معنی‌داری مشاهده نشد ($p>$۰/۰۵). تغییرات رنگی سس مایونز در طی زمان نگهداری عمدتاً به دلیل دو فاز شدن چربی و از دست رفتن رطوبت و برهم خورد توازن فازها و اکسیداسیون چربی صورت می‌گیرد که شاخص زردی تیمارهای افزایش می‌یابد. حضور عصاره سماق با ممانعت از تغییرات اکسیداتیو و فساد میکروبی نقش موثری در کاهش امتیازات رنگ ظاهری تیمارها و افزایش شاخص زردی داشته و با افزایش درصد استفاده از عصاره به دلیل افزایش میزان ترکیبات مؤثره می‌تواند به‌طور موثری باعث حفظ امتیازات رنگ ظاهری تیمارها در طی دوره نگهداری شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات جانبی نامطلوب آنتی اکسیدان‌های سنتزی، امروزه تمایل روزافزونی به استفاده از ترکیبات گیاهی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان های طبیعی در صنایع غذایی قابل مشاهده می‌باشد. امروزه تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تعیین ترکیبات گیاهی مناسب و همچنین تدوین دانش فنی کاربرد آن‌ها در مواد غذایی مختلف در سطح جهان انجام می‌گیرد. با توجه به خطرات مواد نگهدارنده شیمیایی برای مصرف کنندگان، و همچنین با در نظر گرفتن میزان مصرف بالای این فراورده در جهان، جایگزین کردن آن با مواد نگهدارنده طبیعی به صورت جزئی در فرمولاسیون سس مایونز ضروری به‌نظر می‌رسد. ترکیبات عصاره استخراج شده از سماق یکی از این ترکیبات طبیعی است که در این پژوهش اثرات شیمیایی آن بر روی سس مایونز مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست آمده اثرات مثبت عصاره سماق به همراه فسفاتیدیل اتانول آمین را در فراورده سس مایونز به اثبات رساند. بررسی میزان افت خصوصیات حسی، تیمارهایی با مقادیر ۱و ۱/۵ در صد عصاره سماق از مطلوبیت حسی بالاتری برخوردار بود و همچنین افزایش استفاده از فسفاتیدیل اتانول آمین در مقادیر ۰/۰۸ درصد به حفظ خصوصیات حسی بالاتری در مقایسه با تیمار شاهد منجر شد. بنابراین می‌توان ادعا نمود که سس مایونز حاوی عصاره سماق یک محصول کاملاً طبیعی و فراسودمند جدید است که می‌تواند موجب حذف استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی، و تولید محصولی قابل قبولی شود. در نهایت در جهت افزایش خواص عملکردی عصاره سماق و فسفاتیدیل اتانول آمین و کاهش تغییرات نامطلوب ناشی از مصرف غلظت‌های حداکثر ترکیات در رنگ و بافت محصول و تولید محصولی فاقد نگهدارنده پژوهش های بیشتری مورد نیاز است.

منابع

1. Abbasifar, A., Basti, A. A., Karim, G., Bokaie, S., Abbasifar, R., Villa, A. A. & Javan, A. J. (2009). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and starter culture on *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening, and storage of white brined cheese. *Milchwissenschaft*, *64*(4), 438-442.

2. Abdolrezaei, A., Nayeri. H., and Naderi, Gh. A. (2016). The effect of flavonoid compounds obtained by chromatography of filtration gel of sumac plant extract on oxidation. *Scientific Research Journal of Shahid Sadoughi University of Yazd*, 24(2): 735-724.
3. Adeli Milani, M., Mizani, M., Ghavami, M., (2010). Effects of yellow mustard powder on microbial population, pH and organoleptic properties of mayonnaise. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, *5*(2), 35-44.
4. Ajila, L., and Rao, K. (2013). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (12): 3632-3639. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.017
5. Amic, H., Xu, X. M., and Guo, Sh. D. (2003). Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. *Food Science and Technolog*y, 40: 946-954. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.007
6. Anwar, F., Siddiq, A., Iqbal, S., and Rafique, A. S. I. M. (2003). Stabilization of sunflower oil with *Moringa oleifera* leaves under ambient storage. *Journal of Food Lipids*, 14: 35-49. https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2006.00069.x
7. Aslanzadeh, M., Mizani, M., Gerami, A., & Alimi, M. (2013). Evaluation of produced dietary fiber from wheat bran as a fat replacer in mayonnaise. *Journal of Food Technology and Nutrition*, *11*(1), 21-31.
8. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a Review. International *Journal of Food Microbiology*. 94(3):223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
9. Dangelo, F., Amblia, C., Raimo, M., Slwatore, A. (2007). Efeect of anitoxidant activty of polyphenol extract from apple friut. *Journal of agricultural and food chemistry*, 22 (24): 222-227. https://doi.org/10.1021/jf071773a
10. Elhamirad, A. H., Haddad Khodaparast, M. H. (2009). Evaluation of antioxidant and carry through properties of phospholipids in fractionated sheep tail fat, the olein fraction. *Food Technology & Nutrition*, 8(3): 65-71.
11. Fatemi, H. (2013). Food Chemistry. Aej Publications, 395.
12. Ghalavand, R., and Moidina, N. (2014). Application of ultrasonic waves in the extraction of phenolic compounds from plant sources. *The Second National Conference on Medicinal Plants and Sustainable Agriculture*. Hamedan.
13. Ghazi zadeh, M., Razaghi, A. (1998). Basic Semsory methods for food evalvation. Shahid Beheshti University, *Institute of Food Industry and Nutrition Sciences*.
14. Ignat, I., Volf, I., and Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenol compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126 (4): 1821-1835. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026
15. Jabali, A. (2009). The effect of essential oil and extract of Iranian peppermint (Khalvash) on the peroxidation characteristics of sunflower oil. PhD thesis, University of Tehran. Faculty of Veterinary Medicine. Food Hygiene and Control Group. *Field of food hygiene and control*.
16. Jacobsen, C., Meyer, A. S., and Adler- Nissen, J. (1999). Oxidation mechanisms in real food emulsion: oil- water partition coefficients of selected volatile off- flavor compounds in mayonnaise, Z Lebensm Unters F A, 208 (5-6): 317-327. https://doi.org/10.1007/s002170050423
17. Jafari Khatayloo, Y and Almasi, H. (2017). Comparison of the effect of peppermint essential oil and sodium benzoate on physicochemical, microbial, sensory and rheological properties of mayonnaise. *Journal of Food Science and Technology*, 80(15): 169-157.
18. Janine Passos Lima da Leistner, L., Grris, L. M. G. (2012). Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Science Techology*. 6: 35- 67. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88941-4
19. Jewell, N. E. & Nawar, W. W. (2000). Thermal oxidation of phospholipids, J. *Amer. Oil Chem. Soc*., 57, 398-402.
20. Lee, S., Umano, K., Shibamoto, T., and Lee, K. (2005). Identification of volatile components in basil (*ocimum basilicum* L) and thyme leaves and their antioxidant properties. *Food chemistry*, 91:131-137. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.056
21. Majdar Langerodi, A., and Tajik, H. (2016). Antimicrobial effects of Sumac extract with oral coating of chitosan containing *Zataria multiflora* essential oil on red meat in modified and normal atmospheric packaging. *Urmia Medical Journal*, 28(3): 192-205.
22. Michael Davidson, P., Matthew Taylor, T.M, Schmidt, S.E. (2012). "Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds." In Food microbiology (pp. 765-801). American Society of Microbiology.24. https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch30
23. National Standard Organization of Iran. (2007). National Standard No. 4093. Vegetable and animal oils and fats - anisidine number - test method.
24. National Standard Organization of Iran. (2011). National Standard No. 4178. Vegetable and animal oils and fats - Measurement of acid number and acidity- Test method.
25. National Standard Organization of Iran. (2014). National Standard No.4179. Vegetable and animal oils and fats - Measurement of peroxide number- Determination of end point by potentiometric method.
26. National Standard Organization of Iran. (2014). National Standard No. 2454. Microbiology of Mayonnaise and Salad Sauce. Properties and Test Methods.
27. Oliveira, M. L., and Robins, M. M. (2008). Growth of foodborne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions. *Journal of Applied Microbiology*, 78: 601-608. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03106.x

28. Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in Food, Practical Applications*, CRC Press.
29. Politeo, L., and Jukis, S. (2007). Rheological characterization of mayonnaise. Part II: Flow and viscoelastic properties at different oil and xanthan gum concentrations. *Journal of Food Engineering*. 25: 409-425. https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)00010-7
30. Rabiei, K., Bekhradnia, S., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., & Ebrahimzadeh, M. A. (2013). Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of Crataegus pentagyna subsp. elburensis. Natural product research, 26(24), 2353-2357. https://doi.org/10.1080/14786419.2012.658799
31. Rahbari, R., Alami, M., Maghsodlu, Y and Kashani nejad, M. (2012). Investigation of physicochemical and sensory properties of mayonnaise containing wheat germ protein isolate and xanthan gum as an egg substitute. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Industry*, 2: 16-1. DOI: 10.22101/jrifst.2013.07.03.211
32. Rohanian, N., and Sharifi soltani, M. (2015). Study of the effects of sumac extract on microbial, sensory and shelf life of hamburgers. The first national conference on technological achievements of food science and industry. University Jihad Scientific Information Center and Borna Technology Researchers Knowledge-Based Company. Tehran Iran.
33. Saberi, N., and Mohammadifar, M. (2012). Investigation of the effect of oil type on the viscoelastic properties of mayonnaise. *Food Technology & Nutrition*, 9(2).
34. Sarmadina, A. (2015). Antioxidant effects of walnut green peel extract and powder on oxidation of sunflower oil. Iranian *Journal of Nutrition Sciences and Food Industry*, 10(3): 90 -79.
35. Shahin, R., Nayeb zadeh, K., Mohammadi, A. R., and Amiri, Z. (2013). A comparative study of the effects of natural antioxidants (tocopherol, choy and rosemary) and synthetic antioxidant TBHQ on the oxidation process of mayonnaise oil during shelf life. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Industry*, 8(4): 236-227.
36. Shariyat panahi, M., Mizani, M., Sadegh, M., and Alimi, M. (2013). The effect of combined application of flaky tragacanth gum and chitosan on the rheological properties of mayonnaise. Journal of Food Science and Nutrition, 8(2): 51-44.
37. Shariyat, Sh. (1992). New technology for producing all kinds of sauces. Knowledge Boundary Publications. First Edition. 359.
38. Shukla, C., Zhao, Y., Leonard, S. W., and Traber. M. G. (2011). Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (Fragaria× ananassa) and rasp berries (*Rubus ideaus*) postharvest. *Biology and Technology*, 33: 67-78. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.01.008
39. Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Martins, J. T., Quintas, M. A. C., Ferreira, A. N. C. S., Teixeira, J. A., and Vicente, A. N. A. (2011). Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (10): 5589-5594. https://doi.org/10.1021/jf200999n
40. Vermeulen, M., Mohamady, M. A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K. A., Omer, E. A., Pérez-Alvarez, J. A., and Sendra, E. (2006). In vitro antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Journal of Food Control*, 22: 1715-1722. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.003
41. Young Kil, M., Gu lcin, O., and Kufreviog, I. (2009). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. Lebensmittel- Wissenschaft und- Technologie, 36 (2): 263-271. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00226-8
42. Zabetiyan Hoseini, F., Mortazavi, A., Fazli bazaz, S., Koochaki, A., Boolooriyan, SH., (2011). Antimicrobial effect of thyme extract on Salmonella enteritidise PT4 in mayonnaise. *Iranian Journal of Food Science and Industry Research*, 6(2): 90-84.
43. Zhu, D., & Damodaran, S. (2013). Dairy Lecithin from cheese whey fat globule membrane: Its extraction, composition, oxidative stability, and emulsifying properties. *Journal of the American oil chemists Society*, 90(2), 217-224. https://doi.org/10.1007/s11746-012-2152-5

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 235- 247

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۴۷-۲۳۵

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Modelling and optimization of microwave-assisted extraction of rosemary using response surface methodology (RSM)

Bahman Saedpanah[1], Nasser Behroozi[2*], Jalal Khorshidi[3]

Received: 2020.12.15
Accepted: 2021.03.09

How to cite this article:
Saedpanah, B., Behroozi, N., Khorshidi, J. (2022). Modelling and optimization of microwave-assisted extraction of rosemary using response surface methodology (RSM). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 235-247.

Abstract

Introduction: Microwave-assisted extraction (MAE) is one of the newest techniques for extracting essential oils from medicinal plants. Microwave waves penetrate into plant cells and affect the polar molecules, causing heat to build up inside the plant tissue, destroying the cells and releasing the active ingredients. Although in terms of essential oil extraction efficiency, MAE method is slightly higher than Clevenger, but in terms of energy consumption, process time and amount of solvent consumed has an inherent advantage over the Clevenger method. In this study, the aim is to evaluate the quantity and quality of rosemary essential oil in the developed microwave extraction system and process optimization in this system.

Materials and Methods: Rosemary plant (*Rosmarinus officinalis* L.) with 200 g used for each experiment. In this study, a microwave-assisted essential oil extraction system was developed. The system consisted of a home microwave, a distillation condenser, a cold-water source and a pump. In this study, the response surface methodology (RSM) used in the form of a central composite design with 13 treatments. The effect of two independent variables including power in the range of 300 to 900 watts and time in the range of 5 to 35 minutes on the efficiency of essential oil as dependent variables was investigated. To evaluate the quality of the extracted essential oil and compare it with Clevenger treatment, GC-Mass analysis was done using an Agilent technology apparatus (Agilent 7990B, USA).

Results and Discussion: A quadratic model was proposed for modelling of extraction efficiency and it was able to model with the values of R^2, Adj R^2 and Pred R^2, which were 0.9521, 0.9180 and 0.574, respectively. The "Pred R^2" of 0.547 is not as close to the "Adj R^2" of 0.9180 as one might normally expect. The difference is more than 0.2. This may indicate a large block effect or a possible problem with the proposed model and/or data. Things to be considered for model modification are model reduction and response transformation. Results of ANOVA showed that only the linear terms of time, power and quadratic power of time are significant. The normal probability plot showed the normal distribution of errors observed in the experimental design space. The actual measured values R^2 of the extracting efficiency from the experiments versus the values R^2 predicted by the model indicated that this model could estimate the extracting efficiency with a correlation coefficient of 0.746. Box-Cox plot demonstrated for obtaining better results, the data of the amount of essential oil efficiency should be transferred to the power of 0.68 by the power function and the new model should be fitted to the data. Therefore, based on the Box-Cox diagram and the transfer of response data to the power space, as well as the use of a step-by-step method to remove meaningless terms from the model, the proposed model is as shown in equation 6. The results of the new model shows that the Pred R^2 increased from 0.5574 to 0.8644, which indicates an

1 and 2. Former MSc student and Assistant professor, Department of Biosystems Engineering, University of Kurdistan, Iran.
3. Assistant professor, Department of Horticultural Science and Engineering, University of Kurdistan, Iran.
(*Corresponding Author Email: n.behroozi@uok.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67786.1001

improvement in the performance of the new model. Alpha-pinene, camphene, borneol, camphor, cineole, and caryophyllene were the predominant compounds of the essential oil. In 300 and 600-watt treatments with a time of 35 minutes, the amount of dominant compounds of essential oil is slightly higher than Clevenger. However, in the power of 900 watts, due to the increase in temperature, some compounds have been destroyed and the extraction level of some compounds has decreased drastically, and in contrast, the level of caryophyllene was increased to 23.595 %, which indicates a sharp increase in its value at 900 watts. On the other hand, the components of alphapenine, camphor and cineole have the highest medicinal value, which according to Table 8, the highest values for these compounds have been extracted in 300 watt treatment. At the higher microwave power, due to the decomposition of the compounds, the amount of extraction of these compounds was significantly reduced. Also, at 300 watts, the extraction efficiency of these compounds was higher than that of Clevenger, which shows the ability of the MAE method in extracting essential oils from medicinal plants.

The results showed that the amount and quality of essential oil in the MAE with power of 300 and 600 watts was almost the same as Clevenger in most compounds. Essential oil compounds are degraded at 900 watts, so it is recommended not to use maximum power in the experiments. However, if the goal is to extract the highest amount of cariophylene, verbenone and cariophylene oxide in the extracted essential oil, higher power can be used.

Keywords: Essential oil, extraction Time, Response surface method, Microwave, Rosemary.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 235- 247

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۴۷-۲۳۵

مقاله علمی- پژوهشی

مدل‌سازی و بهینه‌سازی استخراج اسانس رزماری به کمک مایکروویو با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

بهمن ساعدپناه[۱]- ناصر بهروزی خزاعی[۲*]- جلال خورشیدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۹

چکیده

توسعه روش‌های نوین برای استخراج اسانس از گیاهان دارویی روزبه‌روز در حال گسترش است. هدف از این پژوهش، پیاده‌سازی و ارزیابی سامانه استخراج اسانس به کمک مایکروویو می‌باشد. ۱۳ آزمایش با سه سطح توان (۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ وات) و سه سطح زمان (۵، ۲۰ و ۳۵ دقیقه) برای اندازه‌گیری بازده اسانس استخراجی در نظر گرفته شد. بازده اسانس استخراجی به کمک روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی (CCD) مدل‌سازی و بهینه‌سازی شد. همچنین نوع و میزان ترکیبات اسانس استخراجی در هر تیمار آزمایشی به کمک کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC- MS) و کروماتوگرافی گازی (GC) تعیین گردید. بازده و کیفیت اسانس استخراجی توسط کلونجر هم به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که مدل درجه دو توانی قادر است بازده اسانس را با R^2، R^2_{Adj} و R^2_{Pre} به‌ترتیب با مقادیر ۰/۹۵۹۰، ۰/۹۴۵۹ و۰/۸۸۶۴ پیش‌بینی کند. همچنین نتایج بهینه‌سازی نشان داد که توان ۸۶۶ وات و زمان ۳۴ دقیقه به‌عنوان شرایط بهینه کاری سامانه اسانس‌گیری به‌دست آمد که با این شرایط کاری بازده اسانس استخراجی به ۰/۳۷ درصد (حجمی/ وزنی) رسید. همچنین تجزیه و تحلیل اسانس‌ها نشان داد در تیمارهای مختلف تعداد و درصد ترکیبات غالب به‌دست آمده متفاوت هستند. در تیمار ۹۰۰ وات، ترکیبات غالب اسانس کاریوفیلن و بورنئول بودند، در حالیکه در تیمارهای ۳۰۰ و ۶۰۰ وات و کلونجر ترکیبات غالب اسانس، آلفاپینن، کامفن و کامفور بودند.

واژه‌های کلیدی: اسانس‌گیری، زمان استخراج، روش سطح پاسخ، کلونجر، مایکروویو.

مقدمه

تقاضای بالای صنایع داروسازی، غذایی، آرایشی و بهداشتی به مواد موثره گیاهان دارویی منجر به توجه فراوان به کشت و اهلی کردن، اصلاح گونه‌های مهم، بررسی شیوه‌های نوین در افزایش عملکرد مواد مؤثره و فرآوری این نوع گیاهان شده است. این عوامل منجر به آن شده است بیشتر کشورها برنامه‌های جامعی برای شکوفایی کشت گیاهان دارویی داشته باشند.

برای ایجاد سودآوری در زمینه گیاهان دارویی، علاوه بر کشت و توسعه مزارع به صورت مکانیزه، نیاز به فرآوری و ایجاد ارزش افزوده بالا برای گیاهان دارویی لازم و ضروری است. اسانس گیاهان دارویی در صنایع زیادی به‌عنوان یک ماده ارزشمند اولیه استفاده می‌شود. روش‌های قدیمی استخراج اسانس مانند کلونجر دارای بازده پایین، زمان طولانی و مصرف بالای حلال برای فرآیند استخراج دارند. همچنین کیفیت اسانس استخراجی به‌خصوص برای مواد حساس به دما کاهش می‌یابد (Omidbaigi, 2009; Bagade and Patil, 2019). لذا توسعه تکنیک‌های جدید و ترکیب فناوری‌ها برای استخراج مواد موثره در گیاهان دارویی، تبدیل یک از نیازهای ضروری در زمینه فرآوری گیاهان دارویی شده است. مزیت اصلی توسعه تکنیک‌ها و فناوری‌های ترکیبی استخراج، افزایش بازدهی تولید و کمک به حفاظت از محیط زیست با کاهش استفاده از حلال و مصرف انرژی فسیلی است (Stashenko et al,. 2004). روش استخراج به کمک مایکروویو (MAE)[۴] یک از این فناوری‌های در حال توسعه می‌باشد. در این روش گیاه با حلال در یک بالن در داخل آون مایکروویو قرار می‌گیرند. امواج مایکروویو به داخل سلول‌های گیاهی نفوذ کرده و با تاثیر بر مولکول‌های قطبی منجر به ایجاد حرارت در داخل بافت گیاهی در

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: n.behroozi@uok.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67786.1001
4 Microwave-assisted extraction(MAE)

نتیجه تخریب سلول‌ها و آزاد شدن مواد موثره می‌گردند (Kaufmann et al., 2001). در این سیستم خنک‌کننده و بخش بازیابی اسانس در خارج از آون قرار دارد. بخارات حلال و اسانس وارد سیستم خنک‌کننده سامانه شده و توسط خنک‌کننده بخارات چگالیده می‌شوند (Stashenko et al,. 2004).

هرچند از نظر بازده استخراج اسانس روش MAE برابر با کلونجر می‌باشد ولی از میزان انرژی مصرفی، زمان و میزان حلال مصرفی دارای مزیت ذاتی نسبت به روش مرجع کلونجر می‌باشد. Lucchesi و همکاران (۲۰۰۴) بیان داشتند که برای گیاه اسطوخودوس، میزان انرژی مصرفی در روش استخراج به کمک مایکروویو (۰/۲۵ کیلووات–ساعت) بسیار پایین‌تر از مقدار انرژی مصرفی در روش تقطیر با کلونجر (۴/۵ کیلووات–ساعت) می‌باشد. همچنین زمان برای استخراج حداکثر میزان اسانس (۳۰ تا ۴۰ دقیقه) بسیار پایین‌تر از زمان لازم (۳۰۰ دقیقه) به روش کلونجر می‌باشد (Farhata et al., 2010; Mandal et al., 2007). تنها نقطه ضعف روش MAE تجزیه برخی از ترکیبات حساس به گرما می‌باشد (Liazid et al., 2007). Mandal و همکاران (۲۰۰۷)، Moret و همکاران (۲۰۱۹) و Bagade و Patil (۲۰۱۹) یک بررسی کامل از پارامترهای تاثیرگذار در روش MAE انجام دادند. بررسی آنها بیان‌گر آن بود که میزان توان مایکروویو، نوع حلال، نسبت ماده به حلال، زمان فرآیند، اندازه ذارت ماده، اختلاط، نحوه کنترل توان مایکروویو و دمای فرآوری از عوامل تاثیرگذار در این روش می‌باشند.

روش MAE برای استخراج اسانس بسیاری از گیاهان معطر و ادویه‌جات استفاده شده است. در پژوهشی برای استخراج اسانس آویشن باغی از قدرت مایکروویو ۹۹۰ وات در طول ۱۲۰ دقیقه در فشار یک اتمسفر، ۲/۵۲٪ اسانس (Golmakani and Rezaei, 2008) و برای مرزه مونتانا، ۰/۷٪ اسانس با توان مایکروویو ۶۶۰ وات در طول ۹۰ دقیقه در فشار اتمسفر به‌دست آمد (Rezvanpanah et al,. 2008). در پژوهش دیگری Dorneles و همکاران (۲۰۲۰) از روش MAE با توان‌های ۷۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ وات با زمان های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه برای استخراج ترکیبات فنلی کاج برزیلی (*Araucaria angustifolia*) استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد بهترین تیمار برای استخراج ترکیبات مورد نظر توان ۱۰۰۰ وات و زمان ۲۰ دقیقه می‌باشد.

استخراج عصاره جلبک قهوه‌ای سارگاسوم با استفاده از MAE نشان داد که فرایند استخراج با حلال آبی، زمان ۳۰ دقیقه و نسبت جلبک به حلال ۱ به ۲۰ تیمار بهینه برای استخراج عصاره از این جلبک می‌باشد (Babakhani Lashkan et al., 2012). Kooshesh و Golmakani (۲۰۱۵) بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست فعال از چغندر قرمز به کمک مایکروویو را انجام دادند. اثر سه متغیر توان، زمان و نسبت حلال متانول به نمونه بر بازدهی کلی استخراج، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد، میزان فنل و فلاوونوئید کل و بتالائین عصاره‌های استخراج شده مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان دهنده آن بود که تیمار با نسبت ۱ به ۲۰ نمونه به حلال، زمان استخراج ۳۰ دقیقه و توان مایکروویو ۲۷۰ وات بهترین تیمار آزمایشی برای فرآیند استخراج می‌باشد (Kooshesh and Golmakani, 2015). Heleno و همکاران (۲۰۱۶) برای استخراج ارگوسترول از فرآورده‌های قارچ از روش MAE استفاده کردند و نتایجشان نشان داد که شرایط استخراج بهینه ۲/۹ ±۱۹/۴ دقیقه، ۱۲/۴ ±۱۳۲/۸ درجه سلسیوس و ۰/۵±۱/۶ گرم/ لیتر بود که در آن بازده ۲۶/۲ ±۵۵۶/۱ میلی‌گرم ارگوسترول در هر ۱۰۰ گرم قارچ حصول گردید. نتایج Arasi و همکاران (۲۰۱۶) برای بهینه‌سازی استخراج به کمک مایکروویو پلی-ساکارید از میوه گواوا (*Psidium guajava* L) به روش سطح پاسخ نشان داد که بازده بهینه استخراج ۶/۸۱٪ در سطح قدرت مایکروویو ۲۰۰ وات، نسبت آب به مواد گیاه ۱ به ۳ و ۲۰ دقیقه از زمان تابش حصول گردید. Belwal و همکاران (۲۰۲۰) برای بهینه‌سازی بازده استخراج و اثر متغیرهای توان مایکروویو، زمان فرآیند، نسبت ماده به حلال و pH حلال بر بازده استخراج از روش سطح پاسخ استفاده کردند. نتایج آنها بیان‌کننده قابلیت روش فوق برای کاهش تعداد آزمایش‌ها به کمک روش سطح پاسخ و مدل‌سازی با دقت مناسب برای بهینه‌سازی فرآیند بود.

در این پژوهش هدف ارزیابی کمیت و کیفیت اسانس‌گیری گیاه رزماری در سامانه توسعه داده استخراج اسانس به کمک مایکروویو و بهینه‌سازی فرایند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) مورد استفاده در این تحقیق از اندام‌های هوایی گیاه رزماری کاشته شده در مزرعه دانشگاه کردستان جمع‌آوری و به‌صورت تازه و تر برای آزمایش‌ها استفاده شد. برای انجام هر آزمایش ۲۰۰ گرم از گیاه رزماری مورد آزمایش قرار گرفت. محتوای رطوبتی اولیه محصول بر اساس استاندارد AOAC (1980)، ۵۳٪ بر پایه‌تر بود.

سامانه اسانس‌گیری

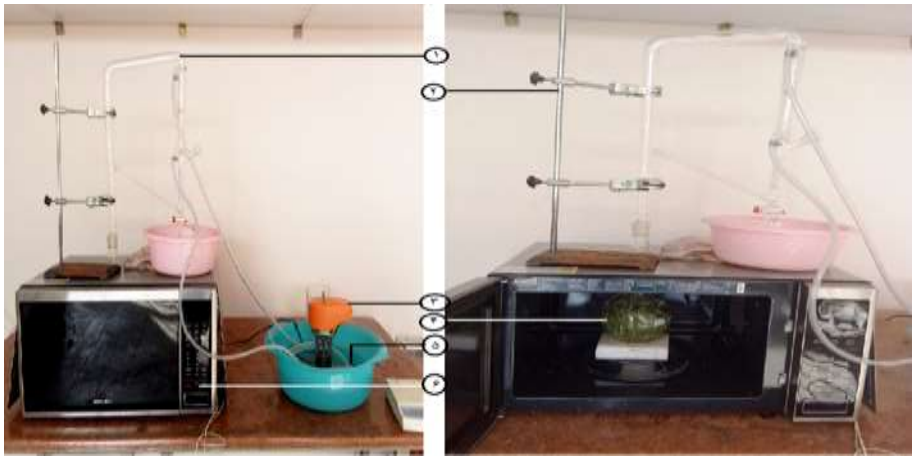
در این پژوهش یک سامانه اسانس‌گیری به کمک مایکروویو توسعه داده شد. این سامانه شامل قسمت‌های زیر بود: یک دستگاه مایکروویو خانگی، بالن، کندانسور تقطیر، منبع آب سرد و پمپ. برای ساخت و توسعه سامانه از یک دستگاه مایکروویو خانگی (Sumsong-ME3410W, Korea) با ابعاد محفظه ۳۴× ۲۴× ۳۴ سانتی‌متر و توان نامی ۹۰۰ وات و فرکانس ۲۴۵۰ هرتز برای تولید امواج مایکروویو با

اعمال تغییراتی در آن، استفاده شد (شکل ۱). محفظه مایکروویو از قسمت بالا سوراخ‌کاری شد و منفذی به قطر ۲ سانتی‌متر به اندازه دهانه لوله بالون ایجاد گردید. مواد خرده شده گیاهی در داخل یک بالن پیرکس به حجم ۱ لیتر قرار داده شد و دهانه خارجه شده بالن از مایکروویو به کندانسور سامانه وصل شد.

برای کندانس کردن بخارات آب و اسانس از آب و یخ با دمای صفر درجه سلسیوس استفاد شد که توسط یک پمپ (الکتروپمپ موتوژن تیپ SH205، ایران) از قسمت پایین وارد کندانسور شده و از بخش بالایی خارج می‌شود و به منبع آب سرد بر می‌گشت. برای اسانس‌گیری ۲۰۰ گرم از اندام هوایی گیاه خرد شد و با نسبت ۵:۲ آب مقطر به گیاه در داخل بالن اضافه می‌شد. سپس بالن حاوی ترکیب گیاه و آب در داخل مایکروویو قرار داده می‌شد. بعد از پایان فرآیند اسانس‌گیری، اسانس جمع شده بر روی آب قرائت و توسط یک سرنگ پزشکی جمع‌آوری می‌شد. سپس اسانس استخراجی توسط سولفات سدیم خشک آبگیری شد. بازده اسانس استخراجی از رابطه ۱ محاسبه می‌شد:

$$\text{بازده اسانس } (\%) = \frac{\text{حجم اسانس استخراجی(میلی‌لیتر)}}{\text{جرم تر ماده(گرم)}} * 100 \qquad (۱)$$

در نهایت اسانس حاصل در یک ظرف تیره ریخته شده و درپوش آن بسته شد و در دمای ۲ تا ۴ درجه سلسیوس تا زمان آنالیز توسط دستگاه‌های کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (Agilent 7990B, USA) در یخچال نگهداری شد (Omidbaigi, 2009). برای کنترل توان مایکروویو، مدار کنترلی دستگاه مایکروویو به‌طور کامل از مدار خارج کرده و از یک رله SSR (40 A- SSR relay, Tiwan)، برد آردینو (Arduino Mega-2560) و برنامه نوشته شده در محیط آردینو برای کنترل توان ورودی به مایکروویو استفاده شد. این برنامه با کنترل زمان روشن و خاموش بودن مایکروویو در یک سیکل کاری ۶۰ ثانیه، توان ورودی به مایکروویو را کنترل می‌کرد. تیمار شاهد در این پژوهش، استخراج اسانس از گیاه رزماری توسط دستگاه کلونجر با نسبت ۵:۲ (آب به گیاه) بود.



شکل ۱- سامانه اسانس‌گیری: ۱- کندانسور، ۲- پایه و گیره، ۳- پمپ آب، ٤- بالن، ٥- آب و یخ، ٦- مایکروویو

Fig. 1. Essential oil system: 1. Condenser, 2. Base and clamp, 3. Water pump, 4. Balloon, 5. Ice and water bath, 6. Microwave.

روند انجام آزمایش‌ها

در این تحقیق از روش سطح پاسخ، در قالب طرح مرکب مرکزی با ۱۳ تیمار استفاده گردید. در این پژوهش تاثیر ۲ متغیر مستقل شامل توان در محدود ۳۰۰ تا ۹۰۰ وات و زمان در محدوده ۵ تا ۳۵ دقیقه بر بازده اسانس به‌عنوان متغیرهای وابسته بررسی گردید. بر اساس تحقیقات پیشین ۳۰ دقیقه برای توان‌های بالای ۱۰۰ وات، زمان کافی می‌باشد (Farhata et al., 2010; Mandal et al., 2007; Moradi et al., 2018). بر اساس پیش‌آزمایش‌ها، زمان ۳۵ دقیقه برای سطح توان ۳۰۰ وات برای استخراج حداکثر اسانس کافی بود، لذا زمان‌های بیشتر از ۳۵ دقیقه در نظر گرفته نشد. داده‌های ثبت شده در هر آزمایش شامل بازده اسانس در هر آزمایش بود. طراحی آزمایش‌ها توسط نرم‌افزار آماری Design Expert 10.0.3 انجام شد. در روش سطح پاسخ برای هر متغیر دامنه‌ای انتخاب می‌شود. به این ترتیب سطح سوم به‌عنوان سطح صفر یا مرکزی (۰)، مقداری بین کمینه و بیشینه است (جدول ۱). این پژوهش دارای دو متغیر مستقل در سه سطح و یک نقطه مرکزی که دارای پنج تکرار است، می‌باشد. در جدول ۲ متغیرها و سطوح کدبندی شده آن‌ها و میزان بازدهی اسانس استخراجی ذکر شده است. بعد از انجام آزمایش بر اساس تیمارهای پیشنهادی بازده اسانس استخراجی اندازه‌گیری در جدول ۲ یادداشت شد.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل و کدبندی با استفاده از روش سطح پاسخ
Table 1- Levels of independent variables and coded using RSM

variable coded level سطوح کد بندی شده متغیر			symbol نماد	variable متغیر
+1	0	-1		
900	600	300	A	Power (w) توان (w)
35	20	5	B	Time (min) زمان (min)

جدول ۲- اندازه‌گیری بازده اسانس
Table 2- Extraction Efficiency

Extraction efficiency بازده اسانس (٪)	Time زمان (min)	Power توان (W)	Treatment Number. شماره آزمایش
0	5	300	**1**
0.3	35	300	**2**
0.25	20	600	**3**
0.27	20	600	**4**
0.25	20	600	**5**
0.37	35	900	**6**
0.05	5	900	**7**
0.35	35	600	**8**
0.35	20	900	**9**
0.07	5	600	**10**
0.22	20	600	**11**
0.15	20	300	**12**
0.25	20	600	**13**

ارزیابی کیفی اسانس

برای ارزیابی کیفی اسانس استخراجی و مقایسه آن با نمونه اسانس استخراجی توسط کلونجر نمونه‌های اسانس به بخش طیف‌سنجی آزمایشگاه مرکزی دانشکده علوم پایه دانشگاه کردستان جهت آنالیز GC-Mass ارسال شد.

مدل‌سازی بازده اسانس به کمک RSM

پس از انتخاب طرح، معادله مدل تعیین شده و ضرایب آن پیش‌بینی می‌شوند. در این پژوهش از مدل خطی (رابطه ۲)، مدل خطی با برهم کنش خطی (رابطه ۳) و درجه دو (رابطه ۴) برای مدل‌سازی استفاده شد.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i \quad (۲)$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum\sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (۳)$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum\sum \beta_{ii} x_i x_j + \in \quad (۴)$$

در روش سطح پاسخ، عموماً معادله مدل درجه دوم کامل یا فرم کاهیده آن است. در رابطه ۳، β_0، β_i، β_{ii} و β_{ij} به‌ترتیب ضرایب ثابت، خطی، درجه دوم و اثر متقابل رگرسیون هستند. X_i و X_j متغیرهای مستقل کد شده هستند. ε باقیمانده یا خطای مدل است. K شمارنده متغیرها است. i و j اندیس‌های متغیرهای مستقل می‌باشند و i کوچک‌تر از j است.

از ضریب تبین پیش‌بینی (R^2_{Pre}) برای تعیین قدرت پیش‌بینی مدل استفاده می‌شود. از نظر آماری مدلی مناسب است که دارای بالاترین مقدار R^2 و R^2_{adj} تصحیح شده و R^2_{Pre} باشد و هرچه مقادیر این ضرایب به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به‌عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد (Samavati, 2013). شرایط عملیاتی بهینه‌سازی کار اسانس‌گیری مایکروویو با استفاده از گزینه بهینه‌سازی عددی بررسی شد. بدین‌ترتیب که ابتدا اهداف بهینه‌سازی مشخص شده و در ادامه، محدوده‌های هر متغیر را براساس درجه‌ی اهمیت تعیین و نیز درجه وزنی برای هر متغیر اعمال گردید و در پایان بهترین جواب‌ها در بخش حل مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

نتایج و بحث

مدل‌سازی بازده اسانس استخراجی

سه مدل خطی، خطی با برهم کنش خطی و مدل درجه دو بر داده‌ها برازش داده شدند و نتایج برازش این مدل‌ها نشان داد که از بین این مدل‌ها، نرم‌افزار مدل درجه دو را پیشنهاد داده است (جدول ۳). این مدل پیشنهادی قادر است با مقادیر R^2، R^2_{adj} و R^2_{Pre} که به‌ترتیب عبارتند از ۰/۹۵۲۱، ۰/۹۱۸۰ و ۰/۵۵۷۴ مدل‌سازی را انجام دهد. این نتایج بر اساس شرکت تمام ترم‌های مدل در معادله نهایی حاصل شده است که دارای مقادیر R^2، R^2_{adj} و R^2_{Pre} گزارش شده در جدول ۳ می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که مدل پیشنهادی دارای قدرت پیش‌بینی پایین است و نیاز به اصلاح برای افزایش قدرت پیش‌بینی دارد.

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج جدول ۴ فقط ترم‌های زمان، توان و توان دوم زمان معنی‌دار هستند و ترم‌های اثر متقابل و توان دوم توان مایکروویو معنی‌دار نیستند. معادله‌ی پیشنهادی بر اساس شرکت تمام ترم‌ها به‌صورت رابطه ۴ حاصل شد. به دلیل فاصله زیاد بین R^2_{adj} و R^2_{Pre} معادله نیاز به اصلاح دارد. برای اصلاح معادله علاوه بر بررسی کفایت آماری مدل پیشنهادی و در صورت لزوم انتقال داده های بر اساس گزارشات کفایت آماری از روش گام به گام برای حذف پارامترهای غیرمعنی‌دار مدل هم استفاده شد تا ترم‌های غیرمعنی‌دار از معادله حذف شوند و نتایج برازش معادله بهبود یابند.

جدول ۳- نتایج مدل‌های برازش داده شده

Table 3- Results of fitted models

Model مدل	R^2_{Pre}	R^2_{adj}	R^2	Std. dev	
Linear خطی	0.7257	0.8463	0.8719	0.048	
2FI	0.3815	0.8293	0.8719	0.050	
Quadratic درجه دوم	0.5574	0.9180	0.9521	0.034	Proposed پیشنهاد شده

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس اثر توان و زمان بر مقدار اسانس

Table 4- Results of ANOVA

	Degree of freedom درجه آزادی	Sum of squares مجموع مربعات	Mean squares میانگین مربعات	F-value	P-value
Model مدل	3	0.74	0.25	69.33**	<0.0001
Power -A	1	0.06	0.06	*18.29	0.014
Time -B	1	0.54	0.54	165.27**	<0.0001
A*B	1	0.000	0.000	0	0.98
A^2	1	3.62e-3	3.62e-3	0.64 n.s	0.45
B^2	1	0.088	0.088	24.42*	0.043
Error خطا	4	3.906e-3	9.021e-4		
Total کل	12	0.79			

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، n.s غیرمعنی‌دار

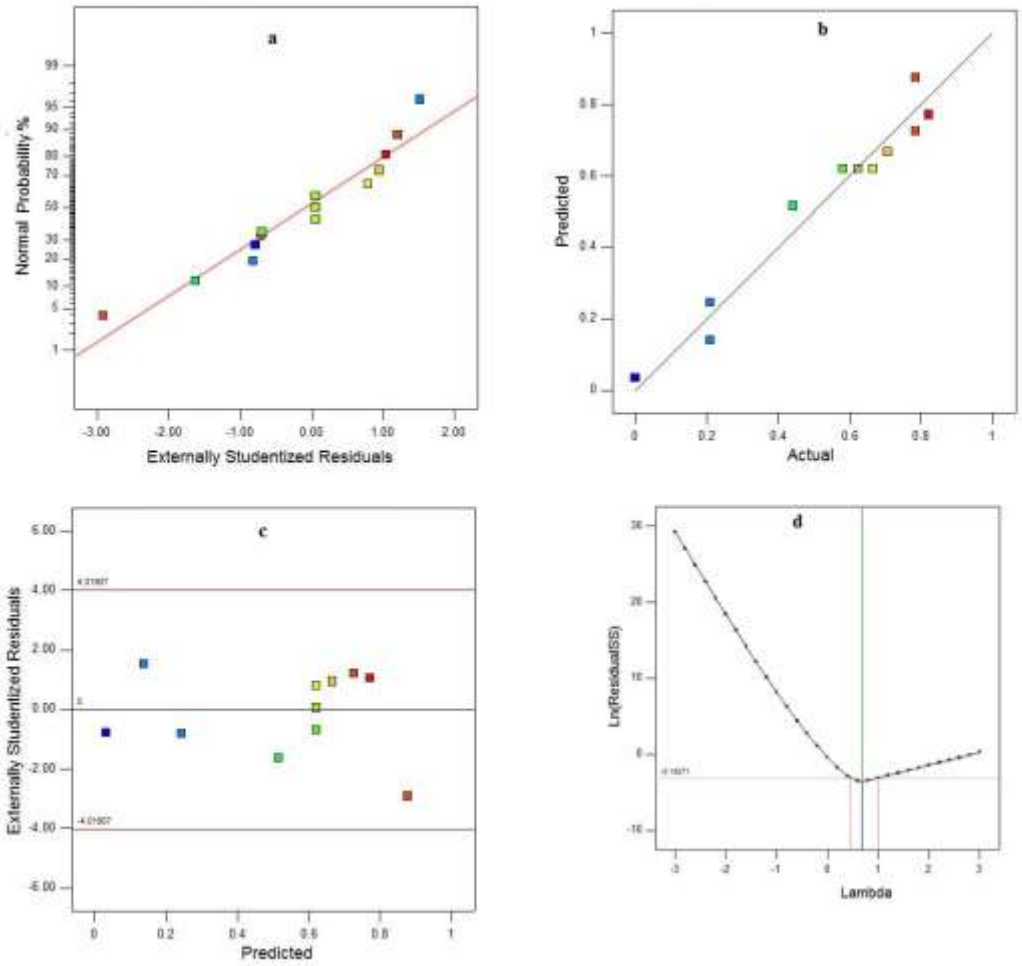
$$(R) = 0.51 + 0.1A + 0.31B + 0.000A * B - 0.036A^2 - 0.11B^2 \quad (۴)$$

$$(R) = -0.4433 + (8.16 * 10^{-4}\text{Power}) + (0.0403\text{Time}) - (2.4710^{-2}\text{Power} * \text{Time}) - (4.02310^{-7}\text{Power}^2) - (4.94 * 10^{-4}\text{Time}^2) \quad (۵)$$

در معادله ۴، R بازده اسانس (بر حسب درصد)، A توان مایکروویو (بر حسب وات) و B زمان (بر حسب دقیقه) می‌باشند.

نمودار احتمال نرمال (شکل ۲- الف) پراکندگی داده‌ها در فضای مدل را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل، می‌توان به خوبی پراکندگی خطی خطاهای مدل‌سازی را مشاهده کرد. این پراکندگی خطی به معنی توزیع نرمال خطاها در فضای ماتریس طراحی آزمایش‌ها است. در شکل (۲- ب) مقادیر حقیقی اندازه‌گیری شده بازده اسانس از آزمایشات در

مقابل مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل ۴ نشان داده شده است. نتایج بیان‌کننده آن است که این مدل می‌تواند بازده اسانس را در محدوده مشخص شده برای متغیرهای مستقل با ضریب همبستگی ۰/۷۴۶ تخمین بزند. قسمت پ شکل ۲ نمودار مقدار مانده‌ها در برابر مقادیر پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد که دارای پراکندگی تصادفی در سراسر نمودار است. این نمودار مقدار مانده‌ها را در مقابل مقادیر پیش‌بینی پاسخ نشان داده و فرض واریانس ثابت را آزمون می‌کند. این نمودار دارای پراکندگی تصادفی، که نشان‌دهنده طیف ثابت مانده، در سراسر نمودار می‌باشد و الگویی به شکل "<" در آن دیده نشد تا نیاز به استفاده از یک تابع انتقال توانی را نشان دهد



شکل ۲- الف- نمودار توزیع نرمال خطاها، ب- مقادیر حقیقی بازده اسانس در مقابل مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل، پ- مقادیر پیش بینی شده در برابر مقادیر مانده‌های استیودنتیده داخلی، ت- نمودار باکس-کاکس برای تعیین درجه تابع مدل

Fig. 3. a) Normal probability plot of residuals, b) actual versus predicted extraction efficiency, c) Studentized residuals versus predicted values, d) Box-Cox plot for power transformations.

در شکل (۲- ت) نمودار باکس- کاکس مدل پیشنهادی نشان داده شده است. این نمودار مناسب‌ترین ابزار برای تشخیص مناسب‌ترین تابع انتقال به منظور اعمال بر متغیر وابسته (مقدار اسانس) می‌باشد. در این نمودار پایین‌ترین، بهترین مقدار لاندا را که در آن حداقل مجموع مربعات مانده در مدل تبدیل شده ایجاد می‌شود را نشان می‌دهد. همچنین در این نمودار محدوده اطمینان ۹۵ درصد نشان داده شده است. بر اساس نتایج مدل بهترین مقدار پیشنهادی برای لاندا برابر ۰/۶۸ است. به عبارتی باید داده‌های مربوط به مقدار اسانس به‌وسیله تابع توانی به توان ۰/۶۸ انتقال داده شوند و مدل جدید بر داده‌ها برازش داده شود که در آن صورت مدل حاصله، حداقل مقدار خطا را خواهد داشت. لذا بر اساس نمودار باکس-کاکس و انتقال داده‌های پاسخ به فضای توانی، و همچنین استفاده از روش گام به گام برای حذف

ترم‌های غیرمعنی‌دار از مدل، مدل پیشنهادی به‌صورت ذیل به‌دست آمد:

$$R^{0.68} = 0.39 + 0.066A + 0.2B - 0.1B^2 \quad (۶)$$

$$R^{0.68} = -0.305 + (3.5 * 10^{-4}\text{Power}) + (0.0504\text{Time}) - (7.35 * 10^{-4}\text{Time}^2) \quad (۷)$$

نتایج مدل ارائه شده جدید در جدول ۵ گزارش شده است که نشان می‌دهد نسبت به مدل قبلی بخصوص R^2_{Pre} از ۰/۵۵۷۴ به ۰/۸۸۶۴ رسید که نشان از بهبود عملکرد مدل جدید می‌باشد.

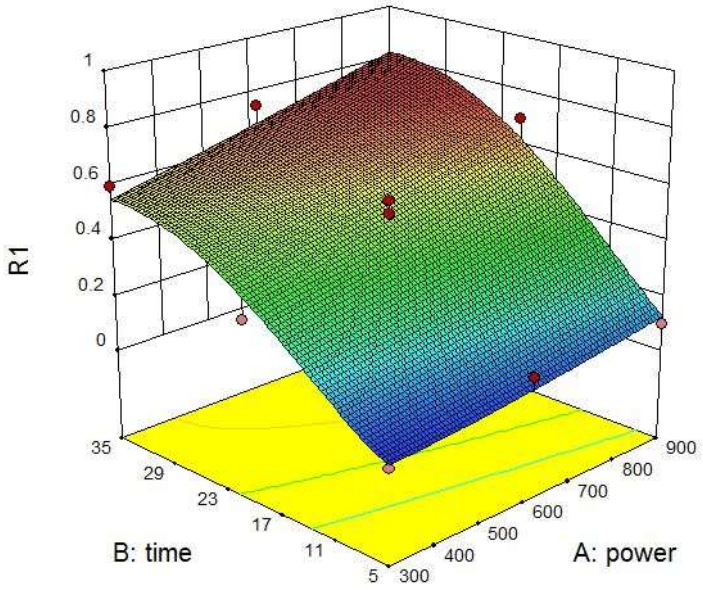
جدول ۵- اطلاعات مربوط به مدل تجربی بازده اسانس استخراجی

Table 5- Experimental model results for extraction efficinacy

Value مقدار	Parameter پارامتر
0.037	**Std. Dev.**
10.98	**% CV**
0.9590	**R^2**
0.9454	**R^2_{adj}**
0.8864	**R^2_{pred}**
0.018	**خطای ریشه میانگین مربعات Root mean square Error (RMSE)**

نمودار سطح پاسخ بازده اسانس استخراجی

نمودار سطح پاسخ، یک تصویر گرافیکی سه‌بعدی می‌باشد که می‌تواند اثرات اختصاصی و تجمعی متغیرها و هم‌چنین اثرات متقابل متغیرهای مستقل بر متغیر وابسته را به تصویر بکشد. سطح پاسخ، خصوصیات هندسی سطح را نمایش می‌دهد و اهمیت ضرایب معادله به تصویر کشیده شده را مورد ارزیابی قرار می‌دهد (Ravikumar et al., 2007). شکل ۳ نمودار سطح پاسخ توان و زمان بر بازده اسانس استخراجی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل قابل مشاهده است، با افزایش توان بازده اسانس استخراجی افزایش دارد. افزایش زمان نیز باعث افزایش چشم‌گیری در بازده اسانس استخراجی می‌شود. مطابق نتایج به‌دست آمده از جدول ۴ اثر متقابل توان و زمان بر بازده اسانس استخراجی معنی‌دار نبوده است. بی‌معنی بودن اثر متقابل دو عامل بر یکدیگر از نظر آماری نشان می‌دهد که هر عامل طوری بر روی خروجی اثر می‌گذارد که گویی عامل دیگر در آزمایش وجود ندارد.



شکل ۳- نمودار سطح پاسخ درصد اسانس استخراجی

Fig. 3. Response surface of extracted essential oil efficiency

بهینه‌سازی فرآیند استخراج اسانس به کمک روش سطح پاسخ

بهینه‌سازی یکی از مهم‌ترین مراحل در طراحی و تحلیل آزمایش‌ها است. از آن‌جا که هدف تحقیق حاضر بهینه‌سازی استخراج اسانس می‌باشد، در این قسمت نتایج مربوط به مناسب‌ترین شرایط برای استخراج اسانس توضیح داده می‌شود تا بتواند نیازهای مورد نظر را تأمین کند. Myers و Montgomery (۱۹۹۵) تابع رضایت‌مندی یا مطلوبیت برای یافتن مناسب‌ترین تیمار آزمایشی پیشنهاد داده‌اند. تابع مذکور، محدوده رضایت برای هر پاسخ را مشخص می‌کند. مقدار رضایت‌مندی بین صفر و یک تغییر می‌کند. در بهینه‌سازی براساس تابع رضایت‌مندی، برای هر متغیر مستقل و هر پاسخ می‌توان هدفی تعیین کرد. اهدافی که در فهرست نرم‌افزار Design Expert وجود دارد شامل موارد: بیشینه، کمینه، عدد مورد نظر، محدوده مشخص و گزینه هیچ‌کدام می‌باشد. نرم‌افزار Design Expert گزینه دیگری هم تحت عنوان درجه اهمیت یا اهمیت وزنی دارد که مقادیر آن از ۱ تا ۵ متغیر است و می‌توان برای پاسخی که مهم‌تر است درجه اهمیت بالاتری لحاظ کرد. پس از تعیین اهداف برای هر متغیر مستقل و پاسخ، نرم‌افزار، ترکیب‌های پیشنهادی از سطوح متغیرها را همراه با تابع رضایت‌مندی هر ترکیب ارائه می‌کند.

در پژوهش حاضر با آن‌که هدف، افزایش میزان استخراج اسانس می‌باشد شروط بهینه‌سازی در جدول ۶ بیان شده است. پس از تعیین کردن هدف مطلوب، تیمارهایی که بتواند نتایج را به سمت اهداف نزدیک کند توسط روش سطح پاسخ و با استفاده از نرم‌افزار Design Expert پیشنهاد شد. در جدول ۷ نتایج بهینه‌سازی و مقادیر مطلوبیت برای هر ترکیب از مقادیر متغیرها مشخص شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از فرآیند بهینه‌سازی، برای رسیدن به هدف‌های مورد نظر می‌توان انتخاب‌های متنوعی داشت. نرم‌افزار تیمار با توان ۸۶۶ وات و زمان ۳۴ دقیقه برای شرایط کاری سامانه اسانس‌گیری پیشنهاد می‌دهد. بازده اسانس استخراجی به ازای مقادیر بهینه متغیرهای کاری پیشنهادی برابر با ۰/۳۸٪ می‌باشد.

جدول ٦- شروط بهینه‌سازی

Table 6- Optimization conditions

Optimization condition شروط بهینه‌سازی	Value مقدار	Parameter پارامتر
Within the specified range در محدوده تعیین شده	300- 900	**Power** **توان (w)**
Within the specified range در محدوده تعیین شده	5- 35	**Time** **زمان (min)**
Maximizing	0.37	**Extraction Efficiancy**

بازده اسانس (%) بیشینه کردن

جدول ۷- نتایج بهینه‌سازی استخراج اسانس رزماری با روش سطح پاسخ به همراه درصد مطلوبیت هر ترکیب

Table 7- Results of optimization of rosemary essential oil extraction by RSM with desirability of each treatments

Number شماره	Power توان	Time زمان	Response پاسخ	Desirability مطلوبیت	
1	886.25	34.438	0.381	1	Elected انتخاب شده
2	862.50	34.250	0.380	1	
3	837.75	34.531	0.382	1	
4	818.438	33.969	0.375	1	
5	900.00	35.00	0.385	1	
6	810.938	34.695	0.377	1	
7	880.313	32.422	0.375	1	
8	772.50	33.875	0.371	1	
9	885.00	33.125	0.378	1	
10	898.106	31.367	0.371	1	
11	747.489	34.577	0.370	1	

ارزیابی کیفیت اسانس استخراجی

اسانس‌های به‌دست آمده از تنوع شیمیایی بالایی در میزان، نوع و تعداد ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه رزماری در توان ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ وات با زمان ۳۵ دقیقه و همچنین در دستگاه کلونجر برخوردار بود. مقدار عمده‌ترین ترکیبات اسانس رزماری در تیمارهای مختلف در جدول ۷ گزارش شده است. آلفا پینن، کامفن، بورنئول،کامفور، سینئول و کاریوفیلن ترکیبات غالب اسانس بودند. در تیمارهای ۳۰۰ و ۶۰۰ وات با زمان ۳۵ دقیقه مقادیر ترکیبات غالب اسانس مقداری بیشتر از کلونجر است. ولی در توان ۹۰۰ وات به دلیل بالا رفتن دما برخی از ترکیبات تخریب شده‌اند و درصد استخراج برخی ترکیبات بشدت کاهش داشته‌اند و در مقابل درصد استخراج کاریوفیلن، وربنون و کاریوفیلن اکسید به‌ترتیب به مقادیر ۲۳/۵۹۵، ۱۰/۹۴ و ۸/۴۱۸ رسیده است که نشان‌دهنده افزایش شدید مقادیر این ترکیبات در ۹۰۰ وات را دارد. کاریوفیلن سنگین‌تر از مونوترپن‌هاست و بخاطر نقطه جوش بالا، در دماها و توان‌های بالا بهتر از بافت گیاه استخراج می‌شود. بدین خاطر در توان۹۰۰ وات درصد استخراج آن بیشتر از بقیه تیمارها است. همچنین بورنئول با ۱۳/۴۸۴ درصد نسبت به تیمار کلونجر، ۶۰۰ و ۳۰۰ وات دارای درصد بالاتری می‌باشد. هر چقدر توان مایکروویو بالا باشد، شدت انتقال انرژی افزایش می‌یابد و دما هم افزایش می‌یابد که منجر به تجزیه ترکیبات اسانس می‌شود. این نتایج با گزارش Mandal و همکاران (۲۰۰۷) و Bousbia و همکاران (۲۰۰۹) که کاربرد توان بالای مایکروویو منجر به تجزیه برخی از ترکیبات می‌شود، همخوانی دارد. همچنین کاهش شدید آلفا پنین از ۲۰/۲۰۸ درصد در توان ۳۰۰ وات به ۶/۰۳۳ درصد در توان ۹۰۰ با نتایج Moradi و همکاران (۲۰۱۸) که افزایش توان مایکروویو منجر به کاهش محسوس این ترکیب می‌شود، همخوانی دارد. از طرف دیگر ترکیبات کاریوفیلن اکسید فقط در تیمار ۹۰۰ مشاهده شده است. همچنین ترکیب دی-لیمونن فقط در تیمار ۳۰۰ و ۶۰۰ وات استخراج شد. از بین ترکیبات غالب اسانس آلفاپنین، کامفور و سینئول دارای بیشترین ارزش دارویی می‌باشند که با توجه به جدول ۸ بیشترین مقادیر برای این ترکیبات در تیمار ۳۰۰ وات استخراج شده است. در توان‌های بالاتر به خاطر تجزیه ترکیبات، مقدار استخراج این ترکیبات کاهش محسوسی داشته‌اند. همچنین در توان ۳۰۰ وات بازده استخراج این ترکیبات نسبت به کلونجر بیشتر است که نشان از ارزشمندی روش MAE در استخراج اسانس از گیاهان دارویی می باشد. عمده‌ترین ترکیبات موجود در روغن فرار رزماری بر اساس پژوهش‌های انجام گرفته در ایران (Ghannadi et al., 2002)، الجزایر (Djeddi et al., 2007)، هندوستان (Rahman et al., 2007) و فرانسه (Miladi et al., 2013) را سینئول، بورنئول، کامفن، آلفاپینن، کاریوفیلن و کامفور تشکیل می‌دهند که بسته به شرایط جغرافیائی محل کشت گیاه، میزان هریک از این ترکیبات متغیر می‌باشد (جدول ۸). در این پژوهش‌ها از کلونجر برای استخراج اسانس استفاده شده است. ترکیبات غالب اسانس استخراجی در پژوهش حاضر نیز با ترکیبات غالب پژوهش‌های فوق الذکر دارای هم‌خوانی می‌باشد.

جدول ۸- مقایسه ترکیبات غالب اسانس گیاه رزماری با مطالعات دیگر

Table 8- Comparison of dominant compounds of rosemary essential oil with other studies

ترکیب	300 W	600 W	900 W	Clevenger	Iran	Algeria	India	France

Compound				کلونجر	ایران	الجزایر	هندوستان	فرانسه
Alpha.-Pinene آلفاپنین	20.208	19.733	6.033	19.835	19.1	10.44	9.94	19.94
Camphene کامفن	5.439	5.756	1.846	5.726	8.90	7.20	6.90	5.339
Berbenol بورنئول	11.668	12.790	13.484	11.298	5.80	8.37	12.76	18.93
Camphor کامفور	12.198	11.619	3.037	10.883	15.90	9.31	26.44	19.87
Cineole سینئول	11.129	9.106	2.839	12.413	16.70	7.38	28.38	11.56
Caryophyllene کاریوفیلن	1.325	1.406	23.595	0.639	9.67	10.90	0.534	2.28
.alpha.-Caryophyllene آلفا کاریوفیلن	-	-	3.853	-	-	-	-	-
Caryophyllene oxide کاریوفیلن اکسید	-	-	8.418	-	-	-	-	-
دی-لیمونن	2.959	2.975	-	-	-	-	-	3.74
beta.-pinene بتا پنین	3.998	4.341	-	4.00	6.20	-	-	-
Verbenone وربنون	4.824	2.285	10.940	3.322	-	-	-	-

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که مقدار و کیفیت اسانس در روش مایکروویو با توان ۳۰۰ و ۶۰۰ وات نسبت به روش کلونجر در اکثر ترکیبات تفاوت چندانی نداشت. در بعضی ترکیبات کیفیت و مقدار اسانس استخراجی بیشتر بود. ترکیبات اسانس در توان ۹۰۰ وات تخریب می‌شود، بنابراین بهتر است که در آزمایشات حداکثر توان اعمال نگردد. البته اگر هدف استخراج بیشترین مقدار کاریوفیلن، وربنون و کاریوفیلن اکسید در اسانس استخراجی باشد، می‌توان از توان بالاتر استفاده کرد. تیماری که بیشترین مقدار اسانس و با ترکیبات اسانس استخراجی نزدیک به کلونجر در توان ۶۰۰ وات بود که در آن اکثر ترکیبات مهم رزماری استخراج شد. اگر از توان ۶۰۰ وات و زمان ۳۵ دقیقه استفاده شود با این شرایط کاری مقدار اسانس استخراجی به ۰/۳۵٪ می‌رسد که نسبت به شرایط پیشنهادی نرم‌افزار (۹۰۰وات با زمان ۳۴ دقیقه) حدود ۰/۳٪ اسانس کمتری استخراج می‌شود. زمان اسانس‌گیری با روش مایکروویو نسبت به اسانس‌گیری با کلونجر بسیار کمتر شد، در نتیجه در مصرف انرژی، صرفه‌جویی خواهد شد.

منابع

Arasi, M. A. S. A. G., Rao, M. G. and Bagyalakshmi, J. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Psidium guajava* L. fruits. *International journal of biological macromolecules*, 91(1), 227- 232. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.039

AOAC. (1980). Official methods of analysis. 13th Edition, Association official analytical chemists, Washington DC.

Babakhani Lashkan, A., Rezaei, M, Rezaei, K., Seifabadi, S. J. (2012). Optimization of extraction of antioxidant compounds in microwave-assisted extracts of brown algae *Sargassum angustifolium*. *Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources*, 65(3), 243- 255. DOI: 10.22059/jfisheries.2012.29488

Belwal, T., Pandey, A., Bhatt, I. D., Rawal, R. S. Optimized microwave assisted extraction (MAE) of alkaloids and polyphenols from Berberis roots using multiple- component analysis. scientific reports, 10, 917. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57585-8.

Bagade, B. B., Patil, M. (2019). Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: A Review, critical reviews in analytical chemistry, DOI: 10.1080/10408347.2019.1686966.

Bousbia N, Vian M. A, Ferhat M. A, Petitcolas E, Melakati, B. Y, Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 114(1):355- 362. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.106

Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I., Skaltsa, H. D. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4), 487-490.

Derwich, E., Benziane, Z., Chabir, R., Taouil, R. (2011). In vitro antibacterial activity and GC/ MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3): 89- 95.

Dorneles, M. S., Norena, C. P. Z. (2020). Extraction of bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* bracts by microwave- assisted extraction. *Journal of food processing and preservation*. 44(6), e14481. DOI:org.ezp.semantak.com/10.1111/jfpp.14481.

FAO. 2016. http://www.FAO.org.

Farhata, A., Fabiano- Tixierc, A. S., Visinoni, F., Romdhanea, M., Chemat. F. (2010). A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: Microwave dry-diffusion and gravity. *Journal of Chromatography*, 1217, 7345– 7350. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.062

Ghannadi, A., Sajadi, S. E., Ei-muslemi, M. A. M. (2002). Phytochemical investigations on flavonoids and constituents of volatile oil of rosmarinus officinalis. *Jundishapur Scientific Medical Journal*, 33:40.

Kooshesh, S., Golmakani, M. T. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*) and evaluating the antioxidant activity of obtained extract. *Electronic Journal of Food Processing and Preservation*, 7 (2): 39-60

Myers, R. H. Montgomery, D. C. (1995). Response surface methodology process and product optimization using designed experiments. *John Wiley and Sons*, New York, U. S. A, P. 714.

Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus*: Optimization by response surface methodology. *Journal of Carbohydrate Polymers*, 95: 588-597. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.041

Miladi, H., Slama, R., Mili, D., Zouari, S, Bakhrouf, A., Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography- mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 5(6):729- 739. DOI:10.4236/ns.2013.56090

Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction– an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 121- 135.

Moret, S., Conchione, Ch., Srbinovska, A., Lucci, P. (2019). Microwave-based technique for fast and reliable extraction of organic contaminants from food, with a special focus on hydrocarbon contaminants. Foods, 8, 503; DOI:10.3390/foods8100503.

Moradi, S., Fazlali, A., Hamedi, H. (2018). Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from rosemary: comparison with traditional distillation. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 10(1): 22-28.

Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction, Journal of Chromatography *A*, 1140 (1- 2), pp. 29- 34. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040

Lucchesi, M. E., Chemat, F. Smalja, J. (2004). Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatogr. A*. 1043: 323-27.

Ravikumar, K., Krishnan, S., Ramalingam, S. Balu, K. (2007). Optimization of process variables by the application of response surface methodology for dye removal using a novel adsorbent. *Dyes and Pigments*, 72(1): 66-74. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.07.018

Rahman, L., Kukerja, A., Singh, S., Singh, A., Yadav, A. Khanuja, S. (2007). Qualitative analysis of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. cultivated in Uttaranchal Hills, India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 16 (1):55– 57.

Omidbaigi, R. (2012). Production and processing of medicinal plants (Vol. 1). Astan Quds Publication, Tehran, 8th edition, pp. 348.

Viuda-Martos, M., Ruíz-Navajas, Y., Fernández-López, J., and Pérez-Álvarez, J. A. (2007). Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. *Acta Chimica Slovenica*, 54(4), 921.

Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., Fu, Y. J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to imain components. *Food Chemistry*, 108(3):1019– 1022. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.046

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 249- 263

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۶۳-۲۴۹

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Effect of addition of bioactive peptide obtained from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on qualitative properties of doogh

Nafiseh Karimi[1], Rezvan Pourahmad[2*], Salman Taheri [3], Orang Eyvazzadeh[4]

Received: 2021.06.10
Accepted: 2021.08.04

How to cite this article:
Karimi, N., Pourahmad, R., Taheri, S., Eyvazzadeh, O. (2022). Effect of addition of bioactive peptide obtained from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on qualitative properties of doogh. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 249-263.

Abstract

Introduction: Yogurt contains valuable compounds, some of which enter yogurt whey and if discarded, remains unused. Yogurt whey has a high nutritional value due to its high quality biological proteins which can be a good source of bioactive peptides. Bioactive peptides are food-derived peptides that are small in size and usually consist of 3- 20 amino acids. These peptides are considered as functional ingredients. Bioactive peptides have antioxidants and antimicrobial properties. The aim of this study was to investigate the effect of adding bioactive peptide derived from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on physicochemical, sensory and microbial properties of doogh during storage.

Materials and Methods: In this study, peptide derived from tryptic hydrolysis of yogurt whey protein fractionated by RP- HPLC was used. Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of this peptide were determined against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. This peptide was incorporated to heated doogh at concentrations of 12, 20, 24, 40, 48, and 80 mg/mL. Moreover, doogh samples were inoculated with 10^6 CFU/mL *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Doogh samples were stored for two months. During 60 days storage, bacterial count, pH, acidity, ABTS radical cation inhibitory activity and sensory properties (taste, odor, texture, color and overall acceptance) of doogh samples were studied.

Results and Discussion: The MIC of yogurt whey peptide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was 12.2 and 24.4 mg/mL, respectively. Moreover, the MBC of yogurt whey peptide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was 12.2 and 48.8 mg/mL, respectively. Addition of this peptide to doogh showed that during storage period, the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* counts, pH and ABTS cation radical inhibitory activity of the samples were significantly decreased, but acidity was increased ($p<0.05$). The peptide of yogurt whey showed good antioxidant and antibacterial activities in doogh samples. By increasing the level of peptide in samples, the ABTS cation radical inhibitory activity was significantly increased ($p<0.05$). During storage, the control sample (without bioactive peptide) showed the highest reduction in antioxidant activity and the lowest reduction was related to the sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide. The ABTS cation radical inhibitory activity of the control sample and sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide was 9.72 and 3.66 Unit/mL, respectively on the 60th day. By increasing the levels of bioactive peptide, pathogenic bacteria counts were decreased ($p<0.05$). The sample containing the highest level of peptide (48.8 mg/mL) was free of *Staphylococcus aureus* and *E. coli* on the 20th day of storage. The control sample and samples containing 12.2 and 24.4 mg/mL bioactive peptide were free of these pathogenic bacteria on the 60th and 40th days, respectively. The highest rate of acidity and pH changes was related to the control sample and sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide had the lowest changes during storage. The acidity of control sample and sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide was 0.68 and 0.56% lactic acid, respectively on the 60th day.The results of sensory evaluation showed that in the control sample and sample containing the lowest level of peptide (12.2

1, 2 and 4. Ph.D. Student, Professor and Assitant Professor , Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran, Respectively.
3. Assistant Professor, Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: rjpourahmad@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70916.1059

mg/mL), the score of sensory characteristics decreased during the storage period, however, the use of the highest level of yogurt whey peptide (48.8 mg/mL) in the doogh formulation was able to reduce the rate of loss of sensory properties and maintain product quality over time. The sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide had the highest score of overall acceptability. Finally, the concentration of 48.8 ppm peptide can be considered as the best level to enrich the doogh in terms of physicochemical, microbial and sensory properties. Therefore, it is concluded that bioactive peptide derived from yogurt whey can be used as a natural antioxidant and antimicrobial agent in fermented dairy products like doogh.

Keywords: Bioactive Peptide, Doogh, Antioxidant Activity, Antibacterial Effect, Shelf Life.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 249- 263

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۶۳-۲۴۹

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی اثر افزودن پپتید زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر ویژگی‌های کیفی دوغ

نفیسه کریمی[۱]- رضوان پوراحمد[۲*]- سلمان طاهری[۳]- اورنگ عیوض‌زاده[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۳

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی اثر افزودن پپتید زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر ویژگی‌های کیفی دوغ بود. پپتید حاصل از هیدرولیز پروتئین آب ماست با تریپسین، که با استفاده از RP-HPLC تفکیک (جزء به جزء) شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های مختلف این پپتید (۱۲/۲۰، ۲۴/۴ و ۴۸/۸ mg/mL) به دوغ اضافه گردید. به‌منظور بررسی اثر ضدمیکروبی این پپتید، تراکم 10^6 CFU/mL از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به دوغ تلقیح شد. طی ۶۰ روز نگهداری، شمارش باکتریایی (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*)، pH، اسیدیته، مهار رادیکال کاتیون ABTS (2, 2′-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) و خواص حسی نمونه‌های دوغ ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که طی دوره نگهداری، تعداد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* ، مقادیر pH و مهار رادیکال کاتیون ABTS در کلیه نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0.05$)، ولی اسیدیته افزایش پیدا کرد. پپتید حاصل از آب ماست فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی خوبی در نمونه‌های دوغ نشان داد، به‌طوری که با افزایش سطح پپتید در نمونه‌ها، مهار رادیکال به‌طور معنی‌داری افزایش و شمارش باکتری‌های بیماری‌زا کاهش یافت ($p<0.05$). تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۴۸/۸ mg/mL) در روز بیستم انبارمانی، فاقد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* بود. نتایج ارزیابی حسی نشان داد که در نمونه شاهد (فاقد پپتید زیست فعال) و نمونه حاوی پایین‌ترین سطح پپتید (۱۲/۲۰ mg/mL)، امتیاز ویژگی‌های حسی طی دوره نگهداری کاهش یافت، ولی استفاده از بالاترین سطح پپتید آب ماست در فرمولاسیون دوغ توانست سرعت اُفت ویژگی‌های حسی را طی دوره نگهداری کاهش داده و کیفیت محصول را حفظ نماید. بر طبق نتایج حاصله، غلظت ۴۸/۸ mg/mL پپتید را می‌توان به‌عنوان بهترین سطح جهت غنی‌سازی دوغ انتخاب کرد. بنابراین پپتید حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست می‌تواند به عنوان عامل آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی طبیعی در محصولات لبنی مانند دوغ مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پپتید زیست‌فعال، دوغ، فعالیت آنتی اکسیدانی، اثر ضدباکتریایی، دوره نگهداری

مقدمه

پپتیدهای زیست‌فعال، توالی‌های خاصی از اسیدهای آمینه هستند و تا زمانی که متصل به سایر اسیدهای آمینه موجود در ساختار اولیه پروتئین باشند، به‌صورت غیرفعال باقی می‌مانند (Harnedy and FitzGerald, 2012). پپتیدهای زیست‌فعال علاوه بر ارزش تغذیه‌ای از لحاظ در اختیار گذاشتن اسیدهای آمینه، تأثیر فیزیولوژیکی در بدن انسان دارند، بنابراین به‌عنوان ترکیبات عملگرا یا فراسودمند نیز در نظر گرفته می‌شوند (Sampath Kumar *et al.*, 2011). این پپتیدهای فعال زیستی که معمولاً از ۲۰-۲ اسید آمینه تشکیل شده‌اند، تا زمانی که توسط آنزیم و یا طی فرآیند تخمیر آزاد نگردند، غیرفعال هستند. شکل آزاد شده این پپتیدها، به دلیل دارا بودن خصوصیات زیست‌فعالی، دارای فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف نظیر تحریک ایمنی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش‌دهنده فشار خون، فعالیت ضدمیکروبی و کاهش‌دهنده کلسترول خون می‌باشند (Agyei Athmani *et al.*, 2015; Tang *et al.*, and Danquah, 2012 ;2015).

امروزه، پپتیدهای ضدمیکروبی به‌عنوان نگهدارنده‌های غذایی ایمن مورد توجه می‌باشند که از آلودگی و فساد مواد غذایی جلوگیری کرده و از آن‌ها در مقابل بیماری‌های مرتبط با غذا محافظت می‌کنند (Shayesteh *et al.*, 2014).چندین نوع پپتید زیست‌فعال (تا ۱۰۰ اسید آمینه) با مشخصات کاتیونی و آب‌گریزی، که دارای فعالیت ضدمیکروبی مؤثر در برابر تعداد زیادی از میکروب‌ها نظیر باکتری‌های

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
۳- استادیار، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: rjpourahmad@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70916.1059

گرم‌مثبت و گرم‌منفی، قارچ‌ها، ویروس و پارازیت‌ها هستند، در مطالعات علمی مختلف نشان داده شده‌اند (Hancock and Sahl, 2006) و تاکنون برخی از انواع پپتیدهای ضدمیکروبی از کازئین و پروتئین‌های سرمی شیر حاصل شده‌اند.

اولین پپتید ضدمیکروبی Casecidin-1 است که از طریق هیدرولیز آنزیمی αS_1 کازئین با تریپسین به‌دست می‌آید، از اسیدآمینه ۱۵۰ تا ۱۸۸ را شامل می‌شود، و از رشد *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ممانعت می‌کند. کاپا کازسیدین از دیگر پپتیدهای مشتق از هیدرولیز کاپا کازئین به‌وسیله تریپسین است. این پپتید شامل ۲۱- ۱۷ اسید آمینه است و فعالیت ضدمیکروبی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *کاندیدا آلبیکانس* نشان می‌دهد (Korhonen and Marnila, 2013). علاوه بر این، گزارش شده است که پپتیدهای به‌دست آمده از پروتئین‌های هیدرولیز شده، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشابه با آنتی اکسیدان‌های سنتزی هستند. از این پپتیدها می‌توان در تولید مواد غذایی ایمن استفاده نمود (Mora *et al*., 2014 Rao *et al*., 2012 a,b;). نحوه عملکرد پپتیدهای دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور کامل مشخص نشده است، ولی بسیاری از محققان اظهار داشتند که پپتیدها می‌توانند از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کنند (Sakanaka *et al*., 2004)، رادیکال‌های آزاد را دفع نمایند (Gómez-Guillén *et al*., 2010)، با یون‌های فلزی تشکیل کمپلکس دهند (Alemán *et al*., 2011) و مولکول‌های اکسیژن فعال را خنثی کنند (Zhuang & Sun, 2011). خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدها در ارتباط با ترکیب، ساختار شیمیایی و خاصیت آب‌گریزی آن‌ها می‌باشد (Chen *et al*., 1998).

دوغ، نوشیدنی حاصل از تخمیر لاکتیکی شیر است که به علت pH پایین و غنی بودن از مواد مغذی، به‌خصوص در دمای محیط، مستعد آلودگی با کپک‌ها و مخمرها و بعضی از باکتری‌ها می‌باشد، که موجب تغییر طعم و عطر محصول و بادکردگی آن در طول زمان نگهداری می‌شود (Salminen *et al*., 2004). این موضوع به‌عنوان یک چالش مهم در صنعت شیر مطرح است؛ بنابراین استفاده از مواد طبیعی و ضدمیکروبی مناسب برای حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری دوغ، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف پپتید زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، حسی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ماندگاری میکروبی دوغ (به‌عنوان یک مدل غذایی) است.

مواد و روش‌ها

جداسازی پپتید زیست فعال از آب ماست

آب ماست از ماست چکیده حاصل از شرکت طراوت (ورامین، ایران) تهیه گردید. برای جداسازی پروتئین آب ماست، pH آب ماست به‌وسیله سود ۰/۱ مولار بر روی ۹ تنظیم شد. پس از ته‌نشینی پروتئین، آب ماست تحت سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس پروتئین آب ماست توسط آنزیم تریپسین (Merck, Germany) در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز شد. هیدرولیزات (آبکافته) تولید شده، طبق روش Salami و همکاران (۲۰۰۸) بر اساس وزن مولکولی توسط غشاهای اولترافیلتر سانتریفوژی که اندازه منافذ آن‌ها به‌ترتیب از بزرگ به کوچک ۱۰، ۵ و ۳ کیلودالتون بود، جداسازی شد. فراکسیون‌های هیدرولیزات (آبکافته) از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بررسی شدند و با توجه به بررسی نتایج حاصله در این مرحله، فراکسیون با محدوده وزن مولکولی ۱۰-۵ kDa به‌عنوان تیمار برتر انتخاب شد. سپس تفکیک (جزء به جزء سازی) فراکسیون‌های پپتیدی طبق روش Asoodeh و همکاران (۲۰۱۲)، با استفاده از RP-HPLC (Knauer, Germany) بر روی ستون آنالیتیکی C18 انجام گرفت. فراکسیون‌های پپتیدی از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بررسی شدند و با توجه به بررسی نتایج حاصله، پپتید زیست فعال با بالاترین خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی جهت افزودن به دوغ انتخاب گردید.

آماده‌سازی دوغ

جهت تولید دوغ، شیر ۱/۵ درصد چربی در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شد. سپس تا دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد سرد شده و در این دما، استارتر ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتو باسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس*) به شیر پاستوریزه اضافه گردید. گرمخانه‌گذاری در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به اسیدیته ۱۲۰ درجه دورنیک صورت گرفت و سپس به ماست تولید شده مقدار ۵۰ درصد آب و ۰/۷ درصد نمک اضافه شد. در مرحله بعد، محصول در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شد و سپس سرد کردن تا دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (Anonymous, 2008). دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1112 و *اشریشیا کلی* PTCC 1330 هریک به میزان 10^6CFU/mL اضافه شده و سپس ۳ غلظت مختلف پپتید زیست‌فعال (این غلظت‌ها پس از تعیین MIC مشخص شدند) به دوغ اضافه گردیدند. نمونه شاهد بدون افزودن پپتید زیست فعال در نظر گرفته شد. آزمون‌های میکروبی در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰ بر روی

نمونه‌های دوغ انجام گرفت. همچنین آزمون‌های فیزیکوشیمیایی و حسی در نمونه‌های دوغ فاقد باکتری‌های بیماریزا، در روزهای مذکور انجام پذیرفت.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[1] و حداقل غلظت کشندگی (MBC)[2]

جهت تعیین MIC از روش میکرودایلوشن[3] استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده مولر هینتون براث بود. در این روش از پلیت‌های ۹۶ چاهکی استفاده گردید و در هر چاهک غلظت مختلف پپتید به همراه سوسپانسیون میکروبی اضافه شده و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ۴۸ ساعت رشد یا عدم رشد در چاهک از طریق اندازه‌گیری جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد.

از چاهک‌هایی که عدم رشد را نشان دادند، در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. پلیت‌های مربوط به چاهک‌هایی که حاوی کمترین غلظت پپتید بوده و در آن رشد باکتری مشاهده نشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Saei-Dehkordi *et al.*, 2010).

شمارش میکروبی

شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* طبق استاندارد ایران شماره ۳-۶۸۰۶ در محیط برد پارکر آگاربا روش کشت سطحی انجام گرفت. گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۴۸ ساعت صورت گرفت (Anonymous, 2006b). شمارش *اشریشیا کلی* در محیط کشت ویولت رد بایل آگار[4] با روش پورپلیت انجام شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۲۴ ساعت صورت گرفت (Ahmadi *et al.*, 2018).

اندازه‌گیری pH و اسیدیته

برای اندازه‌گیری pH و اسیدیته از روش استاندارد ملی به شماره ۲۸۵۲ استفاده شد (Anonymous, 2006a).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS)

برای این منظور، ابتدا یک محلول ۷ مولار ABTS در آب مقطر تهیه گردید. سپس این محلول توسط پرسولفات پتاسیم، اکسید شده سپس به مدت ۱۶- ۱۲ ساعت در تاریکی قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان، محلول رادیکال کاتیون به‌دست آمده به‌وسیله اتانول خالص، ۵۰ بار رقیق و سپس از آن استفاده گردید. به این ترتیب که در هریک از لوله‌های آزمایش آماده شده، ۱ میلی‌لیتر از این محلول ریخته شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه آنتی‌اکسیدان به آن‌ها اضافه گردید، بعد از گذشت ۱۵ دقیقه جذب آن‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر (Uv/Vis 2100، Uniko، آمریکا) خوانده شد. همچنین به یکی از لوله‌های آزمایش نیز به جای نمونه، اتانول اضافه شد (به‌عنوان کنترل) و جذب آن در لحظه اول و نیز بعد از گذشت ۱۵ دقیقه قرائت گردید. سپس درصد بازدارندگی نمونه‌ها از طریق رابطه زیر محاسبه ودر نهایت به صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل اسید اسکوربیک گزارش شد (Miliauskas *et al.*, 2004).

$$\%I = [(A_{b(15)} - A_{s(15)}) / A_{b(15)}] \times 100 \quad (۱)$$

$A_{b(15)}$: میزان جذب شاهد بعد از ۱۵ دقیقه

$A_{s(15)}$: میزان جذب نمونه بعد از ۱۵ دقیقه

$\%I$: درصد بازدارندگی

ارزیابی حسی

ویژگی‌های حسی (مزه، بو، رنگ، بافت و پذیرش کلی) بر اساس روش استاندارد ملی شماره ۲۴۵۳در چارچوب آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای توسط ۷ ارزیاب آموزش‌دیده بررسی شد. نمونه‌های دوغ به طور تصادفی کدگذاری شده و سپس ارزیاب‌ها نمونه‌ها را بررسی کردند، که در ارزیابی حسی شماره ۱ نشان‌دهنده کمترین امتیاز و شماره ۵ نمایانگر بیشترین امتیاز برای هر صفت مورد ارزیابی بود (Anonymous, 2008).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در ۳ تکرار استفاده شد و تجزیه داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 22.0 صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها، از روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید ($p<۰/۰۵$) و نمودارهای مربوطه با نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) پپتید حاصل از آب ماست

مقادیر MIC پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به‌ترتیب ۱۲/۲۰ mg/mL و

1 Minmum Inhibitory Concentration
2 Minimum Bactericidal Concentration
3 Microdilution
4 Violet Red Bile Agar (VRBA)

۲۴/۴۰mg/mL بود. MBC پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به‌ترتیب ۱۲/۲۰ و ۴۸/ ۸۳mg/mL بود.

فعالیت ضدباکتریایی پپتید زیست فعال

فعالیت ضدباکتریایی پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست در مقابل *اشریشیا کلی* در دوغ در جدول ۱ مشخص گردیده است. در روز اول تولید، بیشترین تعداد *اشریشیا کلی*در تیمار شاهد (فاقد پپتید زیست فعال) یافت شد (۵/۹۲Log CFU/mL) و با افزودن پپتید آب ماست و افزایش سطح آن‌ها، شمارش این باکتری گرم‌منفی در دوغ‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری که کمترین تعداد *اشریشیا کلی* در این روز مربوط به تیمار حاوی۴۸/۸ mg/mL پپتید بود (۴/۱۰Log CFU/mL). طی دوره نگهداری، شمارش *اشریشیا کلی* در کلیه تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری که در تیمار شاهد در روز شصتم، در تیمارهای حاوی سطوح ۱۲/۲۰ و ۲۴/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پپتید در روز چهلم و در تیمار حاوی سطوح ۴۸/۸ mg/mL پپتید در روز بیستم انبارمانی، *اشریشیا کلی* یافت نشد. فعالیت ضدباکتریایی پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* در دوغ در جدول ۲ مشخص گردیده است.

در روز اول تولید، نمونه شاهد بیشترین تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* را داشت (۵/۸۶Log CFU/mL) و افزودن پپتید آب ماست و افزایش سطح آن‌ها در نمونه‌های دوغ، منجر به کاهش معنی‌دار تعداد این باکتری در تیمارهای تولیدی گردید ($p<۰/۰۵$). کمترین تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در روز اول انبارمانی مربوط به تیمار حاوی ۴۸/۸ mg/mL پپتید بود (۳/۸۵Log CFU/mL). طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در کلیه تیمارهای دوغ به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری که در تیمار شاهد و تیمار حاوی ۱۲/۲۰ mg/mL در روز شصتم، در تیمار حاوی سطح ۲۴/۴ mg/mL پپتید در روز چهلم و در تیمار حاوی سطح ۴۸/۸ mg/mL پپتید در روز بیستم انبارمانی، *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت نشد.

محققین کاهش شمارش میکروارگانیسم‌های پاتوژن غذایی نظیر *اشریشیا کلی* در نمونه‌های ماست طی دوره انبارمانی در یخچال طی ۱۳ روز را تا حد غیرقابل تشخیص، به حضور شرایط استرس اسیدی در محصولات لبنی تخمیری نسبت دادند (Bachrouri *et al.*, 2002). به‌طور کلی، نگهدارنده‌های طبیعی، میزان pH و شرایط زیست‌محیطی نامطلوب، بر رشد میکروارگانیسم‌ها در فرآورده‌های لبنی تخمیر شده تأثیر می‌گذارند (Adebayo *et al.*, 2014).

اکثر پپتیدهای فعال ضدمیکروبی می‌توانند به غشای میکروبی نفوذ کرده و سبب تخریب آن شوند و یا از غشاء سلولی عبور کرده و اثر خود را بر سلول‌های هدف اعمال نمایند (Sah *et al.*, 2016). Taha و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی خواص عملگرایی پپتیدهای زیست‌فعال ماست تهیه شده از شیر بوفالو نشان دادند که طی دوره نگهداری، در اثر فعالیت باکتری‌های استارتر در ماست، میزان پپتیدهای زیست‌فعال افزایش می‌یابد که این پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از ماست دارای فعالیت ضدباکتریایی خوبی در مقابل باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* هستند.

جدول ۱- شمارش *اشریشیا کلی* (Log CFU/mL) در نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری

Table 1- *Escherichia coli* count in doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage			
	1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.92± 0.03 A,a	4.48± 0.05 B,a	1.46± 0.15 C,a	0.00± 0.00 D,a
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.48± 0.05 A,b	2.77± 0.12 B,b	0.00± 0.00 C,b	0.00± 0.00 C,a
دوغ حاوی ۲٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.05 A,c	1.80± 0.04 B,c	0.00± 0.00 C,b	0.00± 0.00 C,a
دوغ حاوی ٤۸/۸ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	4.10± 0.17 A,d	0.00± 0.00 B,d	0.00± 0.00 B,b	0.00± 0.00 B,a

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲- شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* (Log CFU/mL) در نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری

Table 2- *Staphylococcus aureus* count in doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage			
	1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.86± 0.09 A,a	3.46± 0.15 B,a	1.69± 0.09 C,a	0.00± 0.00 D,a
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.40± 0.17 A,b	2.63± 0.06 B,b	0.36± 0.10 C,b	0.00± 0.00 D,a
دوغ حاوی ۲٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	4.77± 0.07 A,c	1.84± 0.06 B,c	0.00± 0.00 C,c	0.00± 0.00 C,a
دوغ حاوی ٤۸/۸ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	3.85± 0.13 A,d	0.00± 0.00 B,d	0.00± 0.00 B,c	0.00± 0.00 B,a

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

pH و اسیدیته نمونه‌های دوغ

با توجه به شکل ۱، در روز اول تولید، بین مقادیر pH تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتید زیست‌فعال از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$). طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، pH تمام تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). بیشترین تغییرات pH طی دوره نگهداری مربوط به شاهد بود و تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۴۸/۸ mg/mL)، تغییرات کمتری را داشت. به طوری که کمترین pH در روز آخر انبارمانی مربوط به تیمار شاهد بود (۴/۰۸) و تیمار حاوی ۴۸/۸ mg/mL پپتید بیشترین pH را داشت (۴/۲۳).

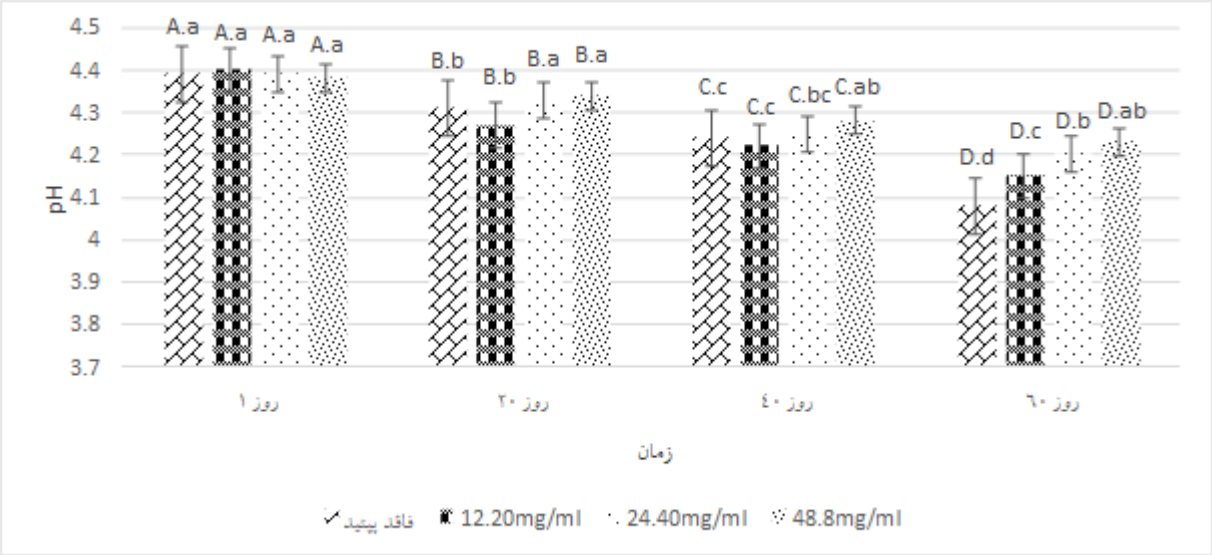
با توجه به شکل ۲، در روز اول تولید، بین مقادیر اسیدیته نمونه شاهد و تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$). طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، مقادیر اسیدیته قابل تیتراسیون کلیه تیمارهای دوغ به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). بیشترین تغییرات اسیدیته طی دوره نگهداری مربوط به شاهد بود و تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۴۸/۸ mg/mL)، تغییرات کمتری را داشت. تا روز ۴۰ انبارمانی، بین مقادیر اسیدیته نمونه شاهد و تیمار حاوی ۱۲/۲۰ mg/mL پپتید از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در روز آخر انبارمانی، بیشترین میزان اسیدیته مربوط به تیمار شاهد بود (۰/۶۸ درصد بر حسب اسید لاکتیک) و تیمار حاوی سطح ۴۸/۸ mg/mL پپتید کمترین میزان را داشت (۰/۵۶ درصد بر حسب اسید لاکتیک).

کاهش pH تیمارهای مختلف دوغ طی دوره نگهداری می‌تواند به‌دلیل مصرف کربوهیدرات باقی‌مانده (لاکتوز) به‌وسیله باکتری‌های لاکتیک و تولید اسید لاکتیک، مقداری کمی دی‌اکسید کربن و اسید فرمیک باشد (Singh *et al.*, Panesar and Shinde, 2011; 2011). همچنین گزارش شده است که کاهش pH می‌تواند به علت فرآیند پس‌اسیدی‌سازی[1] در طول نگهداری به دلیل فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز باشد، که در دماهای صفر تا پنج درجه سانتی‌گراد می‌تواند فعال باقی بماند (Kailasapathy, 2006). برخی محققین کاهش pH را به دلیل حضور آنزیم‌های باقی مانده از فعالیت باکتری‌های استارتر در حین فرآیند تخمیر نسبت می‌دهند (Christopher et al., 2009). پپتید حاصل از پروتئین‌های آب ماست، به دلیل دارا بودن فعالیت ضدمیکروبی، رشد میکروارگانیسم‌ها در تیمارهای دوغ را کاهش داده و از این طریق، سبب کاهش سرعت تغییرات pH نسبت به تیمار شاهد گردید.

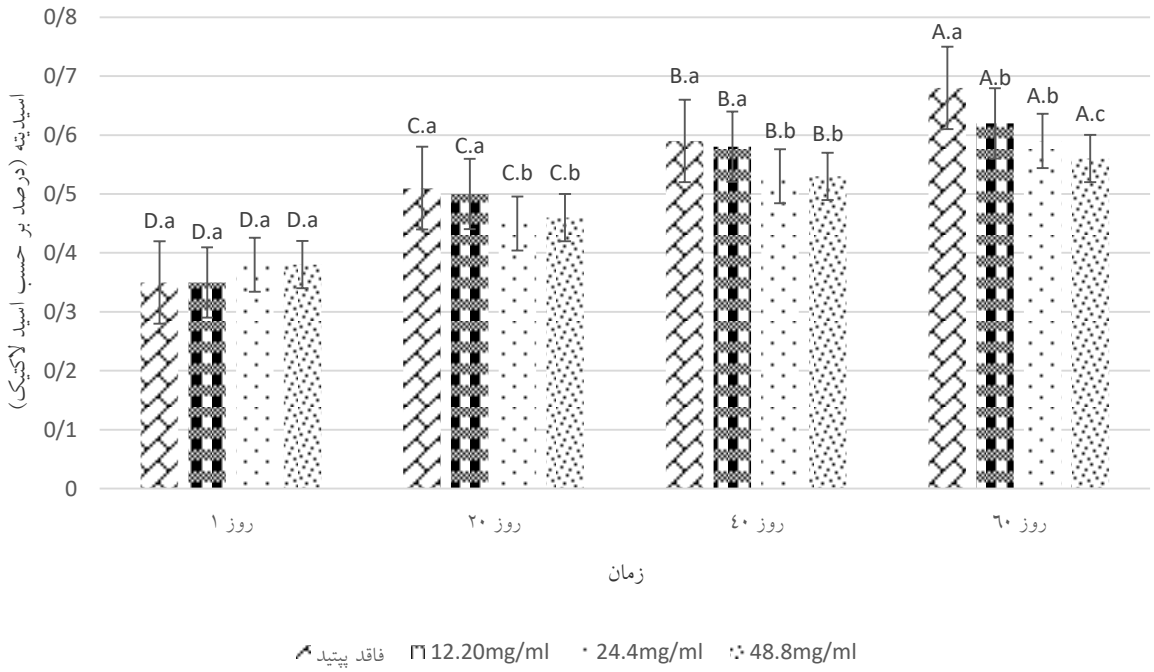
در تحقیق صورت گرفته توسط Ma و همکاران (۲۰۱۹) مشاهده گردید که افزودن هیدرولیزات‌های حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های کازئین، ژلاتین ماهی و گاوی توسط آنزیم کاتالاز به فرمولاسیون ماست قالبی پس‌چرخ تغییر معنی‌داری را در pH و اسیدیته تیمارهای ماست ایجاد نکرد. طی دوره تخمیر ۵ ساعته، مقادیر pH کلیه تیمارها به‌طور قابل توجهی کاهش و اسیدیته افزایش یافت، ولی کاهش pH و افزایش اسیدیته در تیمار حاوی هیدرولیزات کازئین بیشتر از نمونه شاهد و در تیمارهای حاوی هیدرولیزات‌های ژلاتین ماهی و گاوی به طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود (Ma et al., 2019). Won و همکاران (۲۰۱۷) نیز کاهش pH و افزایش اسیدیته در تیمارهای ماست شاهد و حاوی پپتیدهای حاصل از

1 Postacidification

پروتئین آب‌پنیر طی دوره تخمیـر را مشـاهده نمودنـد (Won et al., 2017).



شکل ۱- مقادیر pH نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Fig. 1. pH values of doogh samples during storage



شکل ۲- مقادیر اسیدیته (درصد بر حسب اسید لاکتیک) نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Fig. 2. Acidity values (percentage in terms of lactic acid) of doogh samples during storage

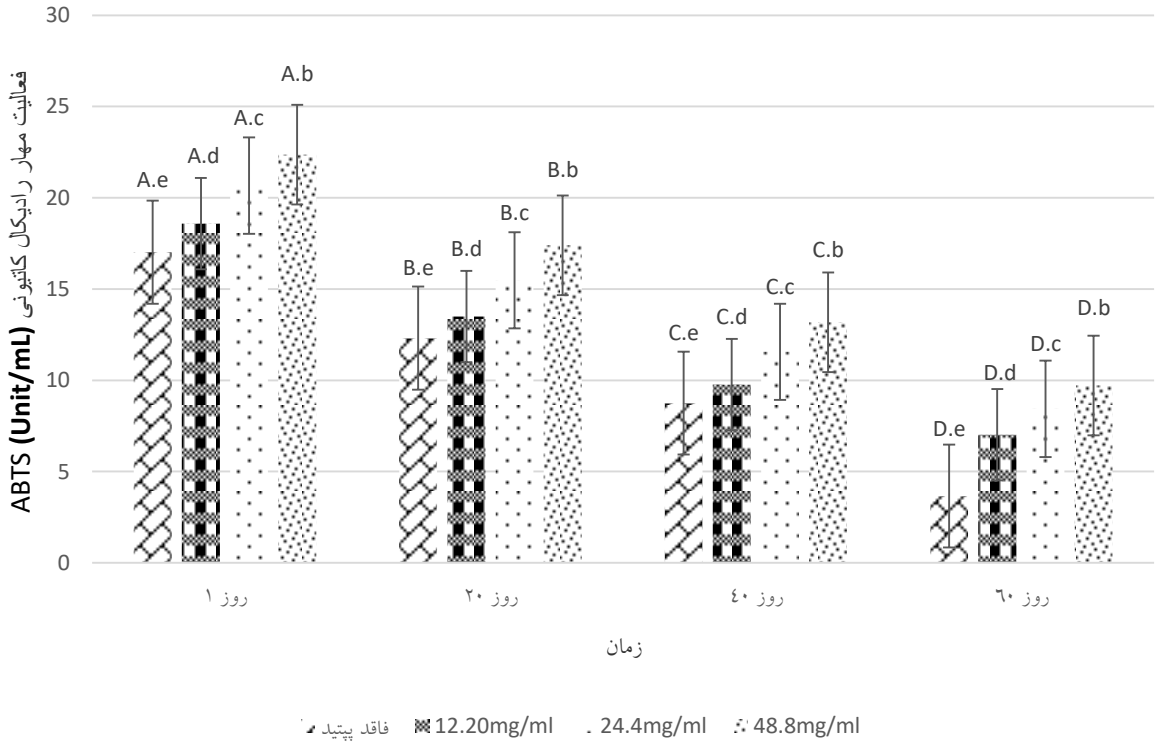
فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS نمونه‌های دوغ

در روز اول تولید، با افزایش سطح پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست، فعالیت مهارکنندگی رادیکالی نمونه‌های دوغ تولیـدی بـه‌طـور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری که در این روز بیشترین و کمترین میزان فعالیت مهـار رادیکـال کـاتیونی ABTS بـه‌ترتیـب مربوط به تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۲۲/۳۶Unit/mL) و تیمار

شاهد (۱۷/۰۲Unit/mL) بود. در تمامی روزها نیز این روند معنی‌داری بین تیمارها مشاهده گردید. طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، فعالیت آنتی اکسیدانی کلیه تیمارهای دوغ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) و بیشترین شدت کاهش آن مربوط به تیمار شاهد بود. در روز آخر انبارمانی نیز بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکالی در تیمار حاوی ۴۸/۸ mg/mL پپتید مشاهده گردید (۹/۷۲ Unit/mL) و کمترین میزان آن مربوط به نمونه شاهد بود (۳/۶۶ Unit/mL) (شکل ۳).

به‌طور کلی، فعالیت‌های زیستی و عملگرایی در هیدرولیزات‌های پروتئینی به‌طور زیادی وابسته به نوع آنزیم به‌کار رفته، سوبسترای پروتئینی و شرایط هیدرولیز دارد. با این حال، پروتئولیز آنزیمی غالباً سبب آزادسازی پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین شده و تعداد گروه‌های قابل یونیزه شدن را افزایش داده و گروه‌های آب‌گریز پنهان شده را در معرض قرار می‌دهد و از طریق فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد (Sarmadi and Ismail, 2010).

در تحقیق انجام شده توسط Kumar و همکاران (۲۰۱۶)، تأثیر سطوح مختلف هیدرولیزات‌های پروتئین شیر شتر بر خواص آنتی‌اکسیدانی امولسیون گوشت بز مورد بررسی قرار گرفته و نتایج حاصله نشان داد که طی دوره انبارمانی ۶ روزه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلیه تیمارها کاهش یافت (Kumar et al., 2016). با افزایش سطوح هیدرولیزات‌های مورد استفاده، فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS به تدریج افزایش یافت، ولی میزان آن همواره کمتر از امولسیون حاوی آنتی اکسیدان سنتزی BHT بود. با این حال، فعالیت احیاکنندگی FRAP و مهار رادیکال آزاد DPPH تیمار حاوی سطح ۰/۰۶ درصد هیدرولیزات کازئین شیر شتر مشابه با تیمار حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی گزارش شد.



شکل ۳- فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS (Unit/mL) نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری

Fig. 3. ABTS cation radical inhibitory activity (Unit/mL) of doogh samples during storage

ویژگی‌های حسی نمونه‌های دوغ

از روز ۲۰ تا ۶۰ نگهداری، میانگین امتیازات بافت کلیه تیمارها به تدریج کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). در روز آخر انبارمانی، نمونه شاهد دارای کمترین امتیاز بافت بود (۳/۴۳) و بین بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$) (جدول ۳). در روز اول تولید، بالاترین امتیاز مزه مربوط به نمونه شاهد (۴/۸۶) و تیمار حاوی سطح ۱۲/۲۰ mg/mL پپتید (۵/۰۰) بود و با افزایش سطح پپتید در فرمولاسیون دوغ، امتیاز مزه کاهش یافت. در تیمار شاهد و تیمار حاوی ۱۲/۲۰ mg/mL پپتید، با گذشت زمان از روز اول تا ۶۰ نگهداری، میانگین امتیازات مزه به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$)، ولی در تیمارهای حاوی سطوح بالاتر پپتید زیست‌فعال آب ماست، طی دوره نگهداری تغییر معنی‌داری در امتیاز مزه مشاهده

نگردید ($p>۰/۰۵$). در روز آخر انبارمانی، بالاترین امتیاز مزه مربوط به تیمار حاوی ۲۴/۴ و ۴۸/۸ mg/mL پپتید بود (به‌ترتیب؛ ۴/۰۰ و ۳/۸۶) و تیمار شاهد کمترین امتیاز مزه را داشتند (۳/۰۰) (جدول ۴).

در روز اول و بیستم نگهداری، بین میانگین امتیازات رنگ نمونه شاهد و تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$). از روز ۲۰ تا ۶۰ نگهداری، امتیازات رنگ اکثر تیمارها به تدریج کاهش یافت که البته معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$). در روز آخر انبارمانی، تیمار حاوی ۴۸/۸ mg/mL پپتید دارای بالاترین امتیاز رنگ بود (۴/۴۳) و بین امتیازرنگ این تیمار و تیمارهای حاوی سطوح ۲۴/۴ mg/mL و ۱۲/۲۰ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$) (جدول ۵).

در روز اول تولید، بین میانگین امتیازات بوی نمونه شاهد و تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در روز آخر انبارمانی، تیمار شاهد کمترین امتیاز بو را کسب کرد (۳/۰۰). در این روز بالاترین امتیاز بو مربوط به تیمارهای حاوی سطوح ۲۴/۴ mg/mL و ۴۸/۸ پپتید بود (۴/۰۰). امتیاز بوی تیمارها طی دوره نگهداری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) که البته این کاهش در تیمار شاهد بیشتر بود (جدول ۶).

جدول ۳- امتیازات بافت نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری

Table 3- Texture scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage			
	1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.00± 0.00 A,a	5.00± 0.00 A,a	4.00± 0.00 B,c	3.43± 0.27 C,c
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	5.00± 0.00 A,a	4.71± 0.24 B,ab	4.14± 0.18 C,ab
دوغ حاوی ۲٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	5.00± 0.00 A,a	4.14± 0.34 AB,bc	4.00± 0.00 B,b
دوغ حاوی ٤۸/۸ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	5.00± 0.00 A,a	4.57± 0.28 B,ab	4.14± 0.18 B,ab

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

جدول ٤- امتیازات مزه نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری

Table 4- Taste scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage			
	1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	4.86± 0.18 A,a	4.29± 0.24 B,a	3.43± 0.18 C,b	3.00± 0.00 D,c
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.43± 0.28 B,a	4.14± 0.18 B,a	3.57± 0.28 C,b
دوغ حاوی ۲٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	4.14± 0.18 A,b	4.14± 0.18 A,ab	4.00± 0.00 A,a	4.00± 0.00 A,a
دوغ حاوی ٤۸/۸ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	4.00± 0.00 A,b	4.00± 0.00 A,b	4.00± 0.00 A,a	3.86± 0.18 A,ab

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۵- امتیازات رنگ نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Table 5- Color scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage			
	1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.00± 0.00 A,a	5.00± 0.00 A,a	4.00± 0.00 B,b	4.00± 0.27 B,b
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.86± 0.18 A,a	4.86± 0.18 A,a	4.14± 0.18 B,ab
دوغ حاوی ۲٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.86± 0.18 AB,a	4.71± 0.24 B,a	4.14± 0.18 C,ab
دوغ حاوی ٤۸/۸ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.86± 0.18 AB,a	4.71± 0.24 B,a	4.43± 0.28 B,a

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.
*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

جدول ٦- امتیازات بوی نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Table 6- Odor scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage			
	1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	4.86± 0.18 A,a	4.14± 0.18 B,b	3.43± 0.28 C,b	3.00± 0.00 D,c
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	4.86± 0.18 A,a	4.71± 0.24 A,a	4.14± 0.18 B,a	3.71± 0.24 C,b
دوغ حاوی ۲٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.71± 0.24 B,a	4.14± 0.18 C,a	4.00± 0.00 C,a
دوغ حاوی ٤۸/۸ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.86± 0.24 AB,a	4.57± 0.28 B,a	4.00± 0.00 C,a

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.
*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

در روز اول تولید، نمونه شاهد و تیمارهای حاوی سطوح ۱۲/۲۰ و ۲۴/۴ mg/mL پپتید، امتیاز پذیرش کلی کامل را کسب کردند (۵/۰۰) و با افزایش سطح پپتید، امتیاز پذیرش کلی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$)، به‌طوری که تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۴۸/۸ mg/mL)، کمترین امتیاز پذیرش کلی را در روز اول داشت (۳/۵۷). در تیمار شاهد و تیمارهای حاوی سطوح ۱۲/۲۰ و ۲۴/۴ mg/mL پپتید، با گذشت زمان از روز اول تا ۶۰ نگهداری، میانگین امتیازات پذیرش کلی به تدریج کاهش یافت ($p<0/05$)، ولی در تیمارهای حاوی بالاترین سطح پپتید زیست‌فعال آب ماست، طی دوره نگهداری تغییر معنی‌داری در امتیاز پذیرش کلی مشاهده نگردید ($p>0/05$). در روز آخر انبارمانی، بالاترین امتیاز پذیرش کلی مربوط به تیمارهای حاوی ۲۴/۴ و ۴۸/۸ mg/mL پپتید بود (به‌ترتیب؛ ۴/۰۰ و ۴/۱۴) و تیمار شاهد کمترین امتیاز پذیرش کلی را داشت (۳/۰۰) (جدول ۷).

نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های حسی تیمارهای دوغ حاوی سطوح مختلف پپتید زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های آب ماست نشان داد که در تیمار شاهد و تیمار حاوی پایین‌ترین سطح پپتید آب ماست (سطح ۱۲/۲۰ mg/mL)، طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، امتیاز ویژگی‌های حسی مختلف نمونه‌های دوغ شامل بافت، مزه، رنگ، بو و پذیرش کلی کاهش یافت، ولی استفاده

از سطح بالاتر پپتید زیست‌فعال (۴۸/۸ mg/mL) حاصل از آب ماست سرعت اُفت ویژگی‌های حسی مختلف نمونه‌های دوغ را طی دوره انبارمانی به طور قابل توجهی کاهش داد، که این اثر احتمالاً در ارتباط با فعالیت‌های عملگرایی(فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی) پپتید زیست‌فعال آب ماست می‌باشد، که منجر به کاهش سرعت تغییرات خواص فیزیکوشیمیایی دوغ‌ها طی دوره انبارمانی شده و تولید محصولات فرعی حاصل از اکسیداسیون و رشد باکتریایی را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. دلیل روند کاهش امتیازات حسی با گذشت زمان نگهداری می‌تواند به افزایش اسیدیته و کاهش pH در تیمارهای مختلف دوغ مرتبط باشد. محققین علت کاهش امتیاز عطر و طعم در نمونه‌های ماست در طی دوره نگهداری را افزایش اسیدیته و کاهش استالدئید بیان نموده‌اند (Guler-Akin and Serdar Akin, 2005). کاهش معنی‌دار امتیاز مزه و پذیرش کلی در تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید زیست‌فعال ماست در روزهای اولیه انبارمانی مشاهده می‌شود، که احتمالاً به دلیل طعم نسبتاً تلخ پپتید در حجم بالا می‌باشد.

در مطالعه انجام شده توسط Farvin و همکاران (۲۰۱۰) گزارش گردید که افزودن پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی ماست دارای وزن مولکولی کمتر از ۱۰kDa به شیر غنی شده با روغن ماهی، تأثیر نامطلوب بر ویژگی‌های حسی نمونه‌ها نداشت (Farvin et al., 2010). با این حال، برخی محققین اظهار داشتند که هیدرولیزهای زیست‌فعال پروتئینی می‌توانند سبب ایجاد بدطعمی و مزه تلخ گردند (Moller *et al.*, 2008). El-Sayed و همکاران (۲۰۱۴) به هیدرولیز کامل پروتئین‌های شیر توسط آنزیم تریپسین پرداخته (به‌طوری که هیچ باندی مشاهده نشد) و تأثیر پپتیدهای تولیدی بر خواص ارگانولپتیکی نوشیدنی عملگرای بر پایه توت‌فرنگی و انبه را مورد بررسی قرار دادند. این محققین دریافتند که استفاده از این پپتیدها در نمونه‌های نوشیدنی موجب ایجاد طعم تلخی گردید، که با استفاده از افزودن ساکارز، فروکتوز و سوکرالوز این تلخی را از بین بردند (El-Sayed et al., 2014). Won و همکاران (۲۰۱۷) اظهار داشتند که شرایط تولید هیدرولیزات‌های پروتئینی می‌تواند بر توسعه تلخی تأثیر داشته باشد. افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز آنزیمی می‌تواند تلخی هیدرولیزات‌های تولیدی را افزایش دهد. دلیل تلخی اکثر هیدرولیزات‌های پروتئینی به حضور پپتیدهای آب‌گریز کوچک در هیدرولیزات‌های تولیدی نسبت داده شده است (Won et al., 2017).

جدول ۷- امتیازات پذیرش کلی نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری

Table 7- Overall acceptance scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage			
	1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.00± 0.00 A,a	4.14± 0.18 B,b	3.57± 0.28 C,b	3.00± 0.00 D,c
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.57± 0.28 B,ab	4.43± 0.28 B,a	3.57± 0.28 C,b
دوغ حاوی ۲٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.71± 0.28 B,a	4.57± 0.28 B,a	4.00± 0.00 C,a
دوغ حاوی ٤۸/۸ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	4.57± 0.28 A,b	4.57± 0.28 A,ab	4.14± 0.18 A,a	4.14± 0.18 A,a

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پس از تلقیح باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به فرمولاسیون دوغ، به دلیل شرایط اسیدی این محصول و همچنین در اثر فعالیت ضدباکتریایی پپتیدهای طبیعی موجود در دوغ و همچنین پپتید حاصل از آب ماست، شمارش این دو باکتری بیماری‌زا در کلیه تیمارهای دوغ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، به‌طوری‌که در نمونه شاهد در روز شصتم این باکتری‌ها یافت نشدند و تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید زیست‌فعال آب ماست، در روز بیستم فاقد *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، مقادیر pH و قدرت مهار رادیکال کاتیونی

ABTS تیمارهای مختلف دوغ کاهش یافت، ولی میزان اسیدیته قابل تیتراسیون افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) نشان داد. افزایش سطح پپتید زیست‌فعال آب ماست در فرمولاسیون دوغ موجب افزایش ($p<۰/۰۵$) فعالیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی نمونه‌های تولیدی شده و سرعت تغییرات pH و اسیدیته طی دوره نگهداری را به‌طور قابل توجهی کنترل کرد. نتایج ارزیابی حسی نشان داد که در نمونه شاهد (فاقد پپتید زیست فعال) و نمونه حاوی پایین‌ترین سطح پپتید (۱۲/۲۰ mg/mL)، امتیاز ویژگی‌های حسی طی دوره نگهداری کاهش یافت، ولی استفاده از بالاترین سطح پپتید آب ماست در فرمولاسیون دوغ توانست سرعت اُفت ویژگی‌های حسی را طی دوره نگهداری کاهش داده و کیفت محصول را حفظ نماید. در نهایت، با توجه به نتایج گزارش شده در این تحقیق، سطح ۴۸/۸ mg/mL پپتید زیست‌فعال آب ماست، به‌عنوان بهترین غلظت جهت غنی‌سازی دوغ تعیین گردید. بنابراین پپتید حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست می‌تواند به‌عنوان عامل آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی طبیعی در محصولات لبنی تخمیری مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Adebayo, C. O., Aderiye, B. I. and Akpor, O. B. (2014). Assessment of bacterial and fungal spoilage of some Nigerian fermented and unfermented foods. *African Journal of Food Science*, 8(3): 140-147.
2. Agyei, D. and Danquah, M. K. (2012). Rethinking food- derived bioactivepeptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science and Technology*, 23(2): 62-69. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.010
3. Ahmadi, S. M., Moslehi Shad, M. and Rahimi, A. (2018). Investigation of antimicrobial activity of oleoresin essential oil on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces marxianus and Penicillium* notatum and its effect on Iranian doogh shelf life. *Journal of Food Science and Technology*, 15, (85): 114-124 (in Persian).
4. Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave- Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez- Guillén, M. C. and Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44: 1044-1051. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.010
5. Anonymous, (2006a). Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk and milk products- Determination of acidity and pH. National standard No. 2852 (in Persian).
6. Anonymous, (2006b). Institute of Standards and Industrial Research of Iran. The comprehensive method for enumeration of coagulase positive *Staphylococcus* sp. (*Staphylococcus aureus* and other species). National standard No. 6806-3 (in Persian).
7. Anonymous, (2008). Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Plain Doogh- Characteristics and test methods. National standard No. 2453 (in Persian).
8. Asoodeh, A., Memarpoor- Yazdi, M. and Chamani, J. (2012). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. *Food Chemistry*, 131: 291-295. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.039
9. Athmani, N., Dehiba, F., Allaoui, A., Barkia, A., Bougatef, A. and Lamri-Senhadji, M. Y. (2015). *Sardina pilchardus* and *Sardinellaaurita* protein hydrolysates reduce cholesterolemia and oxidative stress in rat fed high cholesterol diet. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 5(1): 47-54.
10. Bachrouri, M., Quinto, E. J. and Mora, M. T. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157: H7 during storage of yogurt at different temperatures. *Journal of Food Science*, 67(5): 1899-1903. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08743.x
11. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 49-53. https://doi.org/10.1021/jf970649w
12. Christopher, M. D., Reddy, V. P. and Venkateswarlu, K. (2009). Viability during storage of two *Bifidobacterium bifidum* strains in set and stirred yoghurts containing whey protein concentrate. *Natural Products*, 8: 25-31.
13. El Sayed, M. I., Awad, S., Wahba, A., El Attar, A. M. and Zeidan, M. (2014). Utilization of milk protein hydrolysate in functional beverages. *Alexandra Science Exchange Journal*, 35(1): 39-49. DOI: 10.21608/asejaiqjsae.2014.2572
14. Farvin, K. H. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S. and Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in ω-3 enriched milk. *Food Chemistry*, 123: 1081-1089. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.067
15. Gómez- Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., López De Lacey, A., Alemán, A., Giménez, B. and Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. In: Bihan, E. L., Koueta, N. (Eds.), Sea By-Products as a Real Material: New Ways of Application. Transworld Research Network Signpost, Kerala, pp. 89-115.

16. Guler- Akin, B. and Serdar Akin, M. (2005). Effect of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristic of bio-yoghurt made from goat's milk. *Food Chemistry*, 100: 788-793. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.038
17. Hancock, R. E. W. and Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Natural Biotechnology*, 24: 1551-1557. https://doi.org/10.1038/nbt1267
18. Harnedy, P. A. and Fitz Gerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1): 6-24. https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.001
19. Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 39: 1221-1227. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.013
20. Korhonen, H.J. and Marnila, P. (2013). Milk bioactive proteins and peptides. In: Park,Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), Milk and Dairy Products in Human Nutrition. John Wiley & Sons, Oxford, pp. 148-171. https://doi.org/10.1002/9781118534168.ch8
21. Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N. and Kumar, P. (2016). Effects of incorporation of camel milk casein hydrolysate on quality, oxidative and microbial stability of goat meat emulsion during refrigerated (4± 1◦C) storage. *Small Ruminant Research*, 144: 149-157. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.09.008
22. Ma, Y. S., Zhao, H. J. and Zhao, X. H. (2019). Comparison of the effects of the alcalase-hydrolysates of caseinate, and of fish and bovine gelatins on the acidification and textural features of set-style skimmed yogurt-type products. *Foods*, 8: 1-11. https://doi.org/10.3390/foods8100501
23. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and Beek, T. A. V. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007
24. Moller, N. P., Scholz- Ahrens, K. E., Roos, N. and Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47: 171-182. https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2
25. Mora, L., Escudero, E., Fraser, P. D., Aristoy, M. C. and Toldrá, F. (2014a). Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction. *Food Research International*, 56: 68-76. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.001
26. Mora, L., Reig, M. and Toldrá, F. (2014b). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65: 334-349. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.014
27. Panesar, P. and Shinde, C. H. (2011). Effect of storage on synersis, pH, *Lactobacillus acidophilus* count, bifidobacterium count of *Aloe vera* fortified probiotic yoghurt. *Current Research in Dairy Science*, 11: 935-942.
28. Rao, S., Sun, J., Liu, Y., Zeng, H., Su, Y. and Yang, Y. (2012). ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg-white lysozyme. *Food Chemistry*, 135: 1245-1252. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.059
29. Saei-Dehkordi, S. S., Tajik, H., Moradi, M. and Khaleghi- Sigaroodi, F. (2010). Chemical composition of essential oils in *Zatoria multifloro* Biomass from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6): 1562-1567. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.025
30. Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. and Donkor, O. N. (2016). Antibacterial and antiproliferative peptides in synbiotic yogurt- Release and stability during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 99: 4233-4242. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10499
31. Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. and Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86: 99-103. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.014
32. Salami, M., Yousefi, R., Ehsani, M. R., Dalgalarrondo, M., Chobert, J., Haertlé, T., Razavi, S.H., Saboury, A. A., Niasari- Naslaji, A. and Moosavi- Movahedi, A. A. (2008). Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal*, 18: 1097-1102. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.06.003
33. Salminen, S., Von Wright, A. and Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3rd edition. Marcel Dekker Inc. New York.
34. Sampath Kumar, N., Nazeer, R. A. and Jaiganesh, R. (2011). Purification and bio-chemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides*, 32: 1496-1501. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.020
35. Sarmadi, B. H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31: 1949-1956. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020
36. Shayesteh, F., Ahmad, A. and Usup, G. (2014). Bacteriocin production by a marine strain of *Bacillus* sp. Sh10: isolation, screening and optimization of culture condition. *Biotechnology*, 13: 273-281.

37. Singh, G., Kapoor, I. P. S. and Singh, P. (2011). Effect of volatile oil and oleoresin of anise on the shelf life of yogurt. *Journal of Food Process Preserve*, 35: 778-783. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00528.x
38. Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel- Hamid, M., Khalil, E. and Hassan, D. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures. *Food Science and Biotechnology*, 26(5): 1325-1332. https://doi.org/10.1007/s10068-017-0160-9
39. Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H. and Qi X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptidefrom protein hydrolysate of anchovy cooking waste water byequilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168: 115-123. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.027
40. Won, J. Y., Kim, H. S., Jang, J. A. and Kim, C. H. (2017). Functional properties of yogurt containing specific peptides derived from whey proteins. *Journal of Milk Science and Biotechnology*, 35(4): 249-254.
41. Zhuang, Y. and Sun, L. (2011). Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 76: 483-489. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02108.x

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 264- 276

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۷۶-۲۶۴

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Full Research Paper

Effect of cinnamic acid on shelf life and quality of button mushroom at postharvest period

Hadis Cheraghi[1], Fardin Ghanbari[2*], Mehdi Saidi[3]

Received: 2021.05.03
Accepted: 2021.06.25

How to cite this article:
Cheraghi, H., Ghanbari, F., Saidi, M. (2022). Effect of cinnamic acid on shelf life and quality of button mushroom at postharvest period. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 264-276.

Abstract

Introduction: Button mushroom (*Agaricus bisporus* L.*)* is one of the most popular and widely consumed edible mushrooms that is grown all over the world. However, button mushrooms have a short shelf life of about 3 to 4 days after harvest and lose their commercial value within a few days due to browning of the tissue, water loss, aging and microbial attack. Tissue browning is caused by the activity of polyphenol oxidase (PPO) in plastids on phenolic compounds in the vacuoles as a substrate. Therefore, enzymatic browning is intensified by the loss of membrane integrity due to aging and tissue deterioration and as a result of physical connection between the enzyme and the substrate. The use of some techniques such as the chemicals and physical treatments gives promising results in delaying Browning and increasing the shelf life of edible mushrooms. Cinnamic acid (CA) is an organic acid that occurs naturally in plants and has low toxicity and a wide range of biological activities. Cinnamic acid and its derivatives are widely used in food industry. This compound acts as an inhibitor of polyphenol oxidase activity. On the other hand, cinnamic acid in low concentration has been proposed as an activator of the antioxidant system and its positive effects on reducing the effects of environmental stresses in various plants have been proven in several experiments. Therefore, in the present study, the effect of cinnamic acid treatment on reducing the browning of the tissue and maintaining the quality of white button mushrooms in the post-harvest period has been investigated.

Materials and Methods: Treatments included exogenous application of cinnamic acid at four levels (control, 100, 200 and 400 µM trans cinnamic acid) and storage time at five times (0, 4, 8, 12 and 16 days after storage). Cinnamic acid treatment at the mentioned concentrations was applied by top application 24 hours before mushroom harvest. Distilled water was used for control treatment. At the time of picking, infected, very large and small mushrooms were removed and the same mushrooms with a cap diameter of 40 to 45 mm were collected for each experimental treatment. After harvesting, the mushrooms were placed in a polyethylene box covered with cellophane and after weighing, they were transferred to an incubator at 4°C. In the post-harvest period, different traits were measured with a four day interva.

Results and Discussion: The results showed that by increasing storage time, the activity of polyphenol oxidase and peroxidase increased and consequently the browning of the tissue also had an increasing trend. Also, with increasing storage time, weight loss percentage, hydrogen peroxide and malondialdehyde increased and total phenol and total antioxidant capacity were decreased. The use of cinnamic acid treatment in all three concentrations (100, 200 and 400 µM) reduced the activity of peroxidase and polyphenol oxidase activities and reduced tissue browning. The application of cinnamic acid also improved the quality traits of edible mushrooms such as total phenol, total antioxidant capacity and visual quality index. These findings suggest that application of cinnamic acid, especially at a concentration of 400 µM, could have the potential of inhibiting tissue browning and thus maintaining the mushrooms quality at the postharvest period.

Keywords: Antioxidant capacity, Polyphenol oxidase, Tissue browning, Total phenol, Weight loss.

1, 2, and 3. MSc Student, Assistant professor and Associate professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.
(*Corresponding Author Email: F.ghanbari@ilam.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70214.1041

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 264- 276

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۷۶-۲۶۴

مقاله علمی-پژوهشی

اثر کاربرد سینامیک اسید بر ماندگاری و کیفیت قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت

حدیث چراغی[۱]- فردین قنبری[۲*]- مهدی صیدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۴

چکیده

قهوه‌ای شدن بافت یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کیفیت قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت است که تحت تأثیر آنزیم پلی‌فنل اکسیداز اتفاق می‌افتد. در این تحقیق امکان کاهش قهوه‌ای شدن قارچ خوراکی و حفظ کیفیت آن با کاربرد خارجی سینامیک اسید، به‌عنوان بازدارنده فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز، مورد بررسی قرار گرفت. تیمار سینامیک اسید در چهار سطح (شاهد، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) اعمال شد و پس از آن قارچها به مدت ۱۶ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با افزایش زمان نگهداری فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز افزایش یافت و به تبع آن قهوه‌ای شدن بافت نیز روند افزایشی داشت. همچنین با افزایش زمان نگهداری درصد کاهش وزن، پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدهید افزایش یافت و فنل کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل روند کاهشی داشت. استفاده از تیمار سینامیک اسید در هر سه غلظت (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز شد و قهوه‌ای شدن بافت را کاهش داد. همچنین کاربرد سینامیک اسید سبب بهبود صفات کیفی قارچ خوراکی مانند فنل کل، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و شاخص کیفیت ظاهری شد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سینامیک اسید، خصوصاً در غلظت ۴۰۰ میکرومولار، سبب کاهش قهوه‌ای شدن بافت، حفظ کیفیت و کاهش افت وزن قارچ خوراکی در دوره پس از برداشت می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پلی‌فنل اکسیداز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، قهوه‌ای شدن بافت، کاهش وزن.

مقدمه

قارچهای خوراکی منابع ترکیبات غذایی سودمند مانند پلی ساکاریدها (β-گلوکان‌ها)، فیبر غذایی، ترپن‌ها، پپتیدها، گلیکوپروتئین‌ها، عناصر معدنی، اسیدهای چرب اشباع نشده و آنتی اکسیدان‌ها هستند. همچنین وجود ترکیبات خاص باعث می‌شود که قارچها از نظر درمانی برای بهبود سیستم ایمنی بدن، پیشگیری و کنترل بیماری‌های مختلف مفید باشند (Kalač, 2009).

قارچ *Agaricus bisporus* یکی از معروف‌ترین و پرمصرف‌ترین قارچهای خوراکی است که در سراسر دنیا پرورش می‌یابد. با این حال، قارچهای دکمه‌ای ماندگاری پس از برداشت کوتاهی، حدود ۳ تا ۴ روز، دارند و به دلیل قهوه‌ای شدن بافت، از دست دادن آب، پیری و حمله میکروب‌ها، ارزش تجاری خود را طی چند روز از دست می‌دهند (Jiang et al., 2011). قهوه‌ای شدن بافت‌ها یکی از اساسی‌ترین عواملی است که بر میزان پذیرش محصولات توسط مصرف‌کنندگان تأثیر می‌گذارد. قهوه‌ای شدن بافت در اثر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO) موجود در پلاستیدها بر روی ترکیبات فنلی موجود در واکل‌ها به‌عنوان سوبسترا ایجاد می‌شود (Ding et al., 2016). بنابراین، قهوه‌ای شدن آنزیمی با از بین رفتن یکپارچگی غشا در اثر پیری و زوال بافت‌ها و در نتیجه ارتباط فیزیکی بیشتر آنزیم و سوبسترا تشدید می‌شود (Li-Qin et al., 2009). در واقع حفظ یکپارچگی غشا مانع از خروج ترکیبات فنلی از واکل به سیتوپلاسم شده و اتصال آنزیم PPO به سوبسترا اتفاق نمی‌افتد و در نتیجه پدیده قهوه‌ای شدن به تأخیر می‌افتد (Gao et al., 2014).

گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS)، مانند آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن از طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشا منجر به آسیب غشاهای سلولی شده و تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کنند (Li et al., 2011). برای مقابله با رادیکال‌های آزاد گیاهان مجهز به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی هستند (Singh et al., 2013). در واقع، شبکه آنتی‌اکسیدانی با کنترل سطح ROS و جلوگیری از تخریب غشاهای سلولی منجر به حفظ فاصله فیزیکی بین آنزیم PPO و سوبسترا شده و قهوه‌ای شدن آنزیمی را کاهش می‌دهد (Chomkitichai et al., 2014). بنابراین تأخیر و یا کاهش قهوه‌ای شدن یک تکنیک مهم برای بهبود ماندگاری و کیفیت قارچ خوراکی در دوره پس از برداشت است (Ding et al., 2016).

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: F.ghanbari@ilam.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70214.1041

استفاده از برخی تکنیک‌ها مانند کاربرد مواد شیمیایی و تیمارهای فیزیکی نتایج امیدوار کننده‌ای برای تأخیر در قهوه‌ای شدن و افزایش ماندگاری قارچ‌های خوراکی داشته است. سینامیک اسید یک اسید آلی است که به‌طور طبیعی در گیاهان وجود دارد و دارای سمیت کم و طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی است (Shi et al., 2005). سینامیک اسید و مشتقات آن به‌طور وسیع در صنایع غذایی استفاده می‌شوند و به‌عنوان بازدارنده فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مطرح بوده و با عمل به‌عنوان آنالوگ سوبسترا مانع فعالیت آنزیم می‌شود (Ortiz-Ruiz et al., 2015). از طرف دیگر سینامیک اسید در غلظت پایین به‌عنوان فعال‌کننده سیستم آنتی‌اکسیدانی مطرح بوده و در چندین آزمایش اثرات مثبت آن بر کاهش آثار تنش‌های محیطی در گیاهان مختلف به اثبات رسیده است (Singh et Li et al., 2011 ; al., 2013). در تحقیقی Shi و همکاران (۲۰۰۵) اثرات سینامیک اسید و مشتقات آن (اسید ۲- هیدروکسی سینامین، اسید ۴- هیدروکسی سینامین و اسید ۴-متوکسی سینامین) را بر فعالیت‌های تیروزیناز قارچ سفید مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که سینامیک اسید و مشتقات آن به شدت فعالیت‌های تیروزیناز قارچ را مهار کردند و از شدت قهوه‌ای شدن جلوگیری کردند و سبب بهبود کیفیت در مراحل پس از برداشت شدند (Shi et al., 2005). در این رابطه گزارش شده است که سینامیک اسید عمدتاً از طریق گروه هیدروکسی سوبسترا با جایگاه فعال آنزیم رقابت می‌کند و در تکثیر سلول اثر سمیت نداشته و درصد قهوه‌ای شدن قارچ را به تأخیر می‌اندازد (Hu et al., 2016). همچنین، تیمار پس از برداشت ۴ متوکسی سینامیک اسید سبب کاهش قهوه‌ای شدن و حفظ کیفی قارچ خوراکی در دوره پس از برداشت شد و فرآیندهای مرتبط با پیری را به تأخیر انداخت (Hu et al., 2015). بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی اثر تیمار قبل از برداشت ترانس سینامیک اسید بر قهوه‌ای شدن بافت و صفات کیفی قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۸ در دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل محلول‌پاشی سینامیک اسید در چهار سطح (شامل شاهد، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار ترانس سینامیک اسید) و زمان انبارمانی در پنج زمان (شامل صفر، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ روز پس از برداشت) بود. تیمار سینامیک اسید در غلظت‌های ذکر شده به صورت محلول‌پاشی، ۲۴ ساعت قبل از برداشت قارچ اعمال شد. برای اعمال تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. در زمان چیدن، قارچ‌های بیمار، آسیب دیده و بسیار بزرگ و کوچک حذف شده و قارچ‌های یکسان با قطر کلاهک ۴۰ تا ۴۵ میلی‌متر برای هر تیمار آزمایشی جمع‌آوری شد. قارچ‌ها پس از برداشت در جعبه پلی‌اتیلنی با پوشش سلوفان قرار گرفته و پس از توزین به انکوباتور با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در دوره پس از برداشت به فاصله هر چهار روز یکبار صفات مختلف اندازه‌گیری شد.

درصد کاهش وزن

برای اندازه‌گیری درصد کاهش (افت) وزن نمونه‌های قارچ قبل از نگهداری با ترازوی دقیق با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند. پس از پایان هر دوره اندازه گیری، نمونه‌ها دوباره توزین شده و با استفاده از رابطه ۱ درصد کاهش وزن نسبت به روز شروع آزمایش (روز صفر) محاسبه شد. در این رابطه W_1 وزن نمونه‌ها در شروع آزمایش و W_2 وزن نمونه‌ها در هر مرحله اندازه گیری بود.

$$\text{درصد کاهش وزن} = ((W_1 - W_2) / W_1) \times 100 \quad (۱)$$

شاخص کیفیت ظاهری

کیفیت ظاهری بر اساس رنگ، بافت و درصد کلاهک باز شده بر اساس چهار مقیاس عددی از یک تا چهار تعیین گردید. برای این کار قارچ‌های هر بسته به صورت جداگانه بررسی شد که در آن اعداد یک تا چهار به‌ترتیب برای قارچ‌های ضعیف، نسبتاً خوب، خوب و عالی اختصاص یافت (Jiang et al., 2011).

شاخص قهوه‌ای شدن

برای تعیین شاخص قهوه‌ای شدن، یک گرم پوسته کلاهک با دو میلی‌لیتر متانول ۶۰ درصد به همراه پلی‌وینیل پیرولیدون ساییده شد. پس از رقیق شدن با استفاده از ۸ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درصد، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ (Labnet Prism R) شدند. پس از آن جذب محلول بالایی (روشناور) با استفاده از اسپکتروفتومتر (Specord 50, Analytik Jena) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد و به‌عنوان میزان قهوه‌ای شدن گزارش گردید (Hu et al., 2015).

پراکسید هیدروژن

محتوای پراکسید هیدروژن بر اساس روش Chomkitichai و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد (Chomkitichai et al. 2014). برای این کار یک گرم از بافت قارچ در ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید یک درصد ساییده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Labnet Prism R) شدند. به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره

رویی، ۲/۴ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد. پس از آن جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت و بر اساس منحنی استاندارد میزان پراکسید هیدروژن محاسبه و گزارش گردید.

مالون دی‌آلدهید

اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدهید بر اساس روش Stewart و Bewley (۱۹۸۰) انجام گرفت. برای این منظور ۰/۲ گرم از بافت کلاهک قارچ با اسید تری‌کلرو استیک ۰/۱ درصد کوبیده شده و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و به آن یک میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد وزنی به حجم (w/v) اسید تیو باربیتیوریک دارای اسید تری‌کلرواستیک ۲۰٪ اضافه شد. نمونه‌ها در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از سرد شدن جذب آنها در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد.

فنل کل

برای اندازه گیری مقدار فنل کل از روش فولین- سیکالته استفاده شد (Singleton and Rossi, 1965). به این منظور ۰/۲ گرم نمونه قارچ با اضافه کردن سه میلی‌لیتر متانول ۸۵ درصد کوبیده شد و پس از صاف کردن آن با کاغذ صافی، ۳۰۰ میکرولیتر آن برداشته شد و به آن ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ درصد اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به آن ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد اضافه شده و پس از دو ساعت تکان دادن روی شیکر در دمای اتاق، جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Specord 50, Analytik Jena) اندازه‌گیری شد. با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک و نسبت رقیق شدن در نهایت میزان فنل کل بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک در کیلو گرم وزن‌تر گزارش شد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ۷۵ میکرولیتر از عصاره نمونه به همراه ۲۹۲۵ میکرو لیتر محلول DPPH مخلوط شد. بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حالت خود رها شده و مجدداً جذب آنها قرائت شد. با استفاده از رابطه ۲ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌ها در تیمارهای مختلف محاسبه گردید. که در این رابطه A_{t0} جذب محلول در زمان صفر و A_{t30}، جذب محلول در زمان ۳۰ دقیقه بود (Bondet et al., 1997).

$$\text{فعالیت آنتی‌اکسیدانی} = [A_{t0} - A_{t30} / A_{t0}] \times 100 \qquad (۲)$$

فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها، ۰/۲ گرم بافت قارچ با استفاده از ۲ میلی‌لیتر بافرفسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار حاوی یک میلی‌مولار EDTA بر روی یخ ساییده شد. پس از سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی جمع شده و به‌عنوان عصاره خام آنزیم برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Plewa و همکاران (۱۹۹۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی، ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم، ۱۰۰ میکرولیتر پر اکسید هیدروژن و ۱۰۰ میکرولیتر گوایکول بود. جذب نمونه به مدت ۲ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد. همچنین فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز بر اساس روش Kar و Mishra (۱۹۷۶) با استفاده از پیروگالول به‌عنوان سوبسترا اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹,۱) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

درصد کاهش وزن

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی زمان و سینامیک اسید در سطح آماری یک درصد بر کاهش وزن معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل زمان× سینامیک اسید در سطح یک درصد بر این صفت معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که با افزایش زمان نگهداری درصد کاهش وزن به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین کاهش وزن (۲/۸۵ تا ۴/۲۵ درصد) در ۱۶ روز پس از نگهداری به‌دست آمد. کاربرد سینامیک اسید در هر سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار درصد کاهش وزن را نسبت به شاهد کاهش داد. بیشترین تأثیر سینامیک اسید در زمان ۱۶ روز نگهداری مشاهده شد که تیمار ۴۰۰ میکرو مولار آن درصد کاهش وزن را نسبت به شاهد ۳۳ درصد کاهش داد (شکل ۱).

شاخص کیفیت ظاهری

اثر زمان و سینامیک اسید در سطح آماری یک درصد بر شاخص کیفیت ظاهری معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل زمان× سینامیک

اسید در سطح ۵ درصد آماری بر شاخص کیفیت ظاهری معنی‌دار شد (جدول ۱).

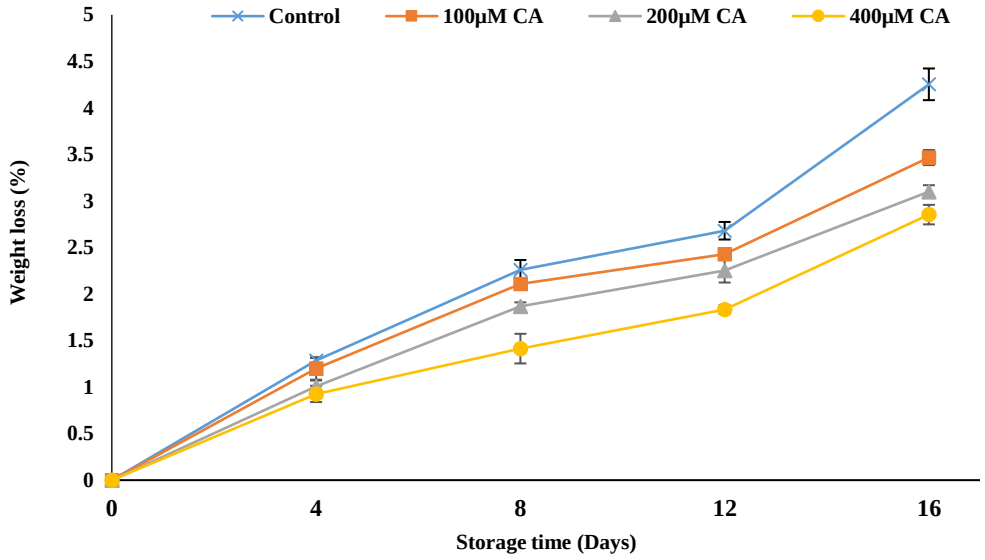
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی قارچ دکمه‌ای تحت تأثیر سینامیک اسید و زمان نگهداری

Table 1- ANOVA for evaluated traits of button mushroom subjected to cinnamic acid and storage time

منبع تغییرات S.O.V	df	کاهش وزن Weight loss	کیفیت ظاهری Visual quality	شاخص قهوه‌ای شدن Browning index	پر اکسید هیدروژن Hydrogen peroxide	مالون دی آلدهید Malon-dialdehyde	فنل کل Total Phenol	ظرفیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity	فعالیت پراکسیداز Peroxidase activity	فعالیت پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase activity
زمان Time	4	19.76**	11.09**	0.272**	320.07**	25.22**	358236**	775.64**	250.69**	2611.16**
سینامیک اسید Cinnamic acid	3	1.28**	0.34**	0.019**	15.02**	1.18**	15290**	109.54**	11.98**	249.17**
زمان* سینامیک اسید Time× Cinnamic acid	12	0.17**	0.08*	0.004**	1.72**	0.26**	3093**	15.47ns	2.06**	34.64**
خطا Erorr	40	0.02	0.03	0.001	0.66	0.08	694	12.65	0.55	13.14
ضریب تغییرات CV (%)	-	8.59	6.32	6.34	4.68	11.23	3.24	5.56	6.15	14.78

**معنی‌دار در سطح ۱ درصد، *: معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ns: عدم معنی‌داری.

** and * indicate significant at the 0.01 and 0.05 of probability levels, respectively, and ns indicates non- significant.



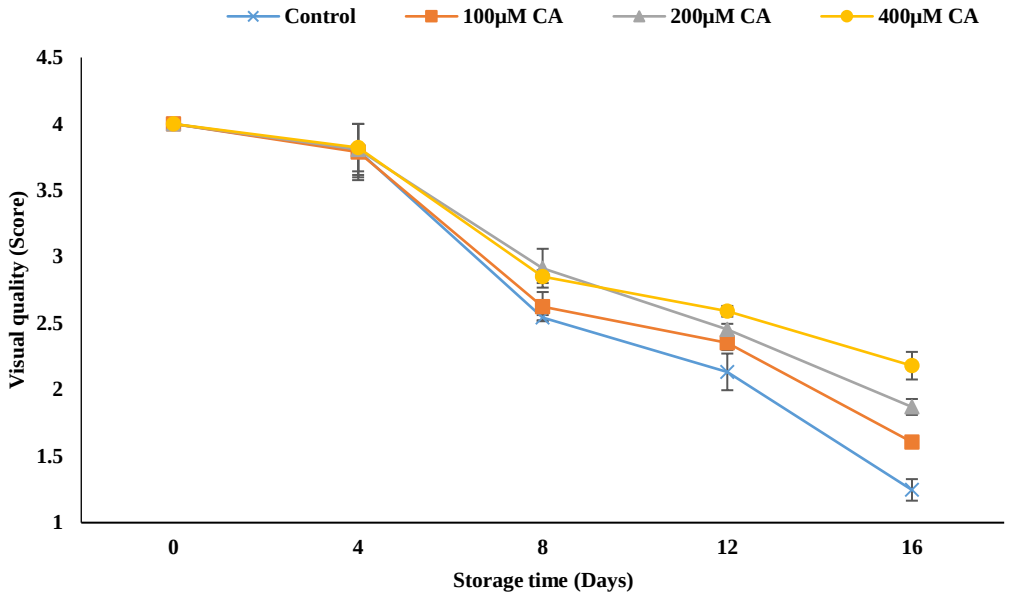
شکل ۱- اثر سینامیک اسید (CA) بر درصد کاهش وزن قارچ دکمه‌ای در زمان‌های مختلف نگهداری.

میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد سه تکرار هستند.

Fig. 1. Effect of cinnamic acid (CA) on the weight loss of button mushrooms at different storage times.

The vertical bars represent the standard deviation of three replications.

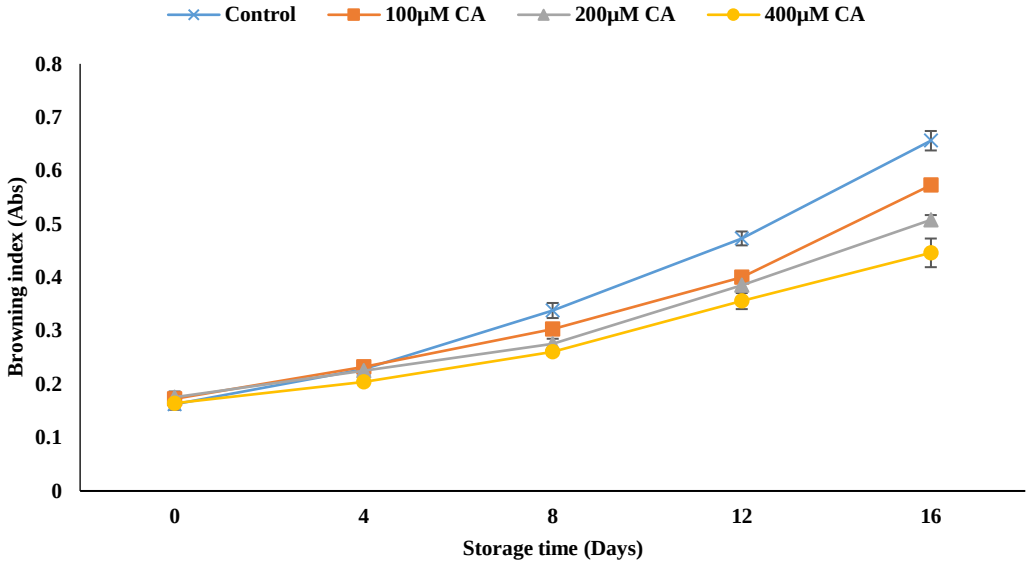
مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که با افزایش زمان نگهداری تا ۴ روز کیفیت ظاهری قارچ دکمه‌ای افت شدید نداشت ولی پس از آن کیفیت ظاهری قارچ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و به کمترین مقدار خود در روز ۱۶ام رسید. تیمار سینامیک اسید در روزهای ۸، ۱۲ و ۱۶ تأثیر معنی‌داری بر کیفیت ظاهری قارچ در دوره پس از برداشت گذاشت. هر سه غلظت سینامیک اسید تأثیر معنی داری بر حفظ کیفیت قارچ در دوره پس از برداشت داشتند ولی تیمار ۴۰۰ میکرو مولار مؤثرتر از تیمارهای دیگر بود (شکل ۲).



شکل ۲- اثر سینامیک اسید (CA) بر شاخص کیفیت ظاهری قارچ دکمه‌ای در زمان‌های مختلف نگهداری.

میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد سه تکرار هستند.

Fig. 2. Effect of cinnamic acid (CA) on the visual quality of button mushrooms at different storage times.
The vertical bars represent the standard deviation of three replications.



شکل ۳- اثر سینامیک اسید (CA) بر شاخص قهوه‌ای شدن قارچ دکمه‌ای در زمان‌های مختلف نگهداری.

میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد سه تکرار هستند.

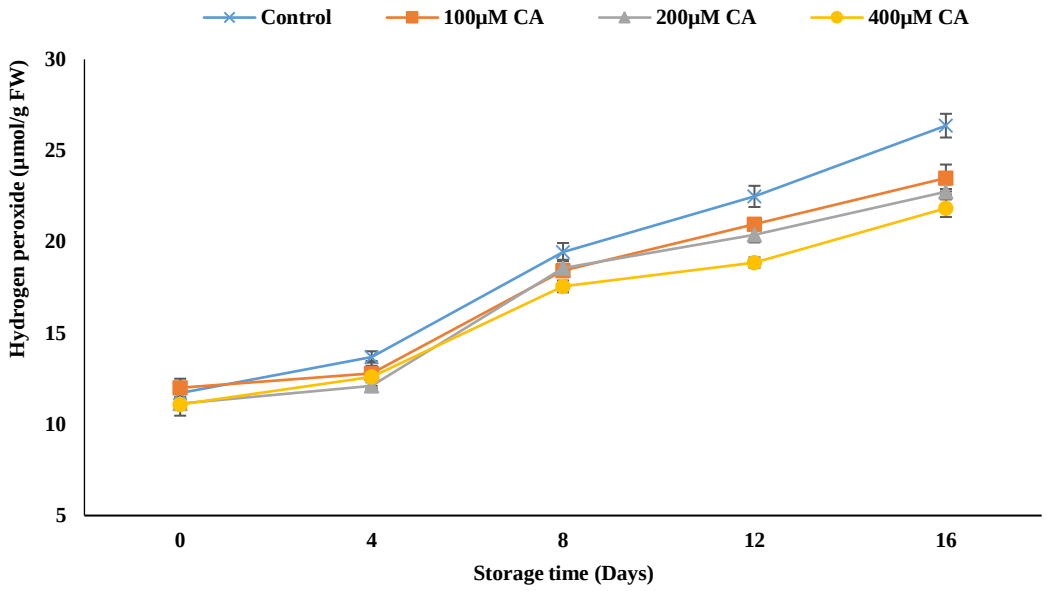
Fig. 3. Effect of cinnamic acid (CA) on the browning index of button mushrooms at different storage times.
The vertical bars represent the standard deviation of three replications.

شاخص قهوه‌ای شدن

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی زمان و سینامیک اسید و همچنین اثر متقابل زمان× سینامیک اسید در سطح آماری یک درصد بر شاخص قهوه‌ای شدن معنی دار شد (جدول ۱). با افزایش زمان نگهداری شاخص قهوه‌ای شدن بافت قارچ به‌صورت خطی افزایش یافت. از طرف دیگر تیمارهای سینامیک اسید قهوه‌ای شدن بافت را نسبت به شاهد کاهش دادند. تیمار ۴۰۰ میکرومولار سینامیک اسید موثرترین تیمار در کاهش شاخص قهوه‌ای شدن بود و در زمان‌های ۸، ۱۲ و ۱۶ روز شاخص قهوه‌ای شدن را به‌ترتیب ۲۳، ۲۵ و ۳۲ درصد نسبت به شاهد کاهش داد (شکل ۳).

پراکسید هیدروژن

نتایج نشان داد که محتوای پراکسید هیدروژن تحت تأثیر زمان، سینامیک اسید و اثر متقابل این تیمارها معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش زمان نگهداری قارچ دکمه‌ای محتوای پراکسید هیدروژن روند افزایشی داشت به‌طوری که بیشترین میزان آن در روز ۱۶ام و کمترین آن در روز اول آزمایش مشاهده شد. در تمام زمان‌های آزمایش، غیر از زمان صفر، تیمارهای سینامیک اسید محتوای پراکسید هیدروژن را نسبت به شاهد به طور معنی داری کاهش دادند. هر سه تیمار سینامیک اسید (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو مولار) تأثیر معنی‌داری در کاهش پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد داشتند و با افزایش زمان نگهداری اثر بخشی تیمارها بیشتر شد (شکل ۴).



شکل ٤- اثر سینامیک اسید (CA) بر پراکسید هیدروژن قارچ دکمه‌ای در زمان‌های مختلف نگهداری.

میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد سه تکرار هستند.

Fig. 4. Effect of cinnamic acid (CA) on the hydrogen peroxide of button mushrooms at different storage times.

The vertical bars represent the standard deviation of three replications.

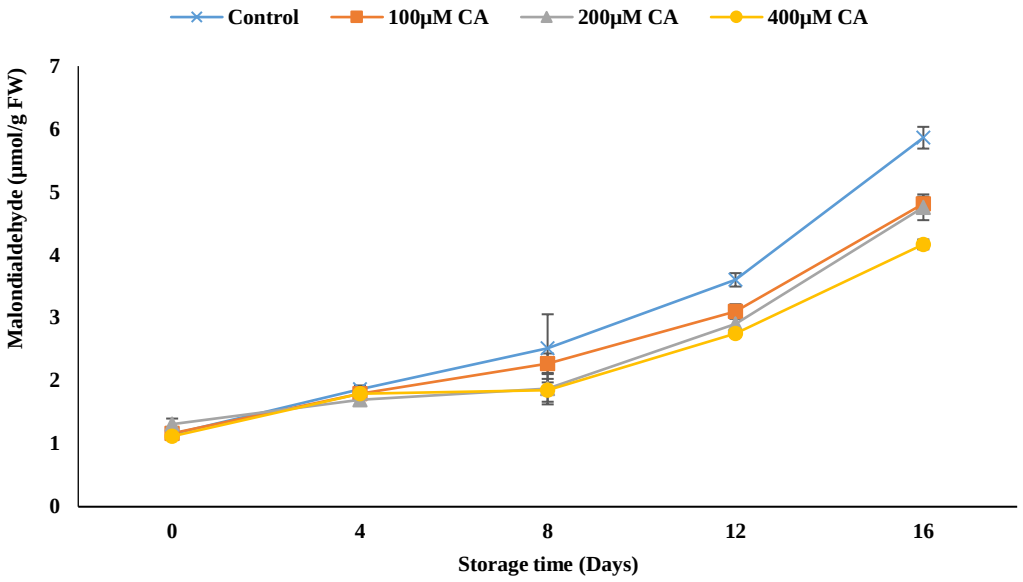
مالون دی‌آلدهید

نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی زمان و سینامیک اسید و اثر متقابل این دو تیمار در سطح یک درصد بر محتوای مالون دی آلدهید معنی دار شد (جدول ۱). تا روز ۸ام آزمایش محتوای مالون دی‌آلدهید با شدت کم روند افزایشی داشت ولی پس از آن، به خصوص در روز ۱۶ام، با شدت بیشتر روند افزایشی گرفت. در زمان‌های صفر، ۴ و ۸ روز استفاده از سینامیک اسید تأثیر معنی‌داری بر مالون دی‌آلدهید نسبت به شاهد نداشت ولی در روزهای ۱۲ و ۱۶ کاربرد سینامیک اسید در هر سه غلظت محتوای مالون دی آلدهید را نسبت به شاهد کاهش داد (شکل ۵).

فنل کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی زمان و تیمار در سطح یک درصد بر محتوای فنل کل معنی دار شد. همچنین اثر متقابل زمان× سینامیک اسید در سطح یک درصد بر فنل کل معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که تا روز ۴ام آزمایش محتوای فنل کل روند افزایشی داشت و پس از آن به‌طور معنی داری کاهش یافت و به کمترین میزان خود در روز ۱۶ام رسید. از طرف دیگر، تیمارهای سینامیک اسید در روزهای صفر و ۴ تأثیر معنی‌داری بر فنل کل نسبت به شاهد نداشتند، ولی هر سه تیمار ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو مولار سینامیک اسید در روزهای ۸، ۱۲ و

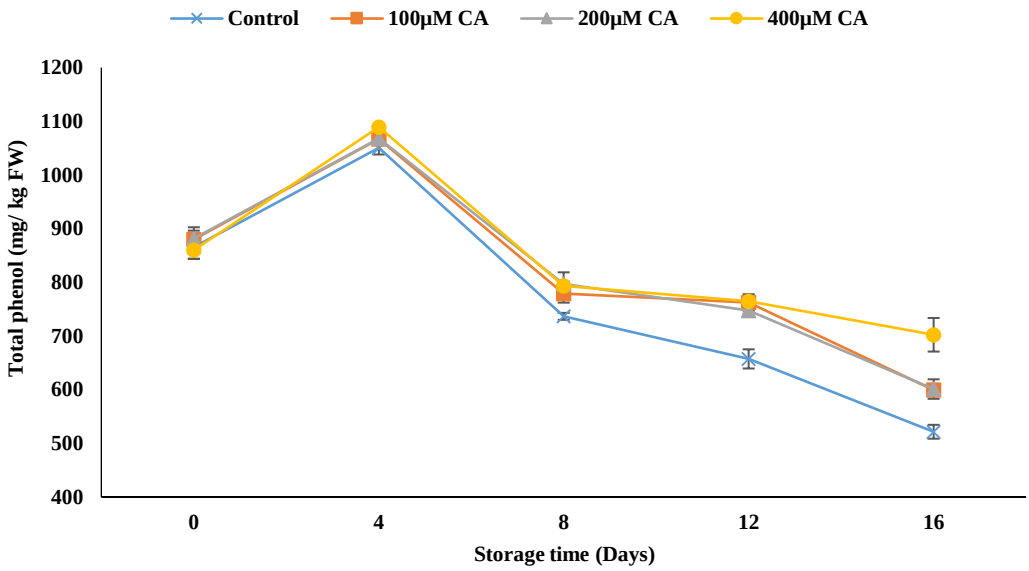
۱۶ روز، محتوای فنل کل را نسبت به شاهد افزایش دادند. در روز ۱۶ام آزمایش تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار سینامیک اسید به‌ترتیب ۱۴، ۱۵ و ۳۴ درصد فنل کل را نسبت به شاهد افزایش دادند (شکل ۶).



شکل ۵- اثر سینامیک اسید (CA) بر محتوای مالون دی آلدهید قارچ دکمه‌ای در زمان‌های مختلف نگهداری.

میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد سه تکرار هستند.

Fig. 5. Effect of cinnamic acid (CA) on the malondialdehyde content of button mushrooms at different storage times.
The vertical bars represent the standard deviation of three replications.



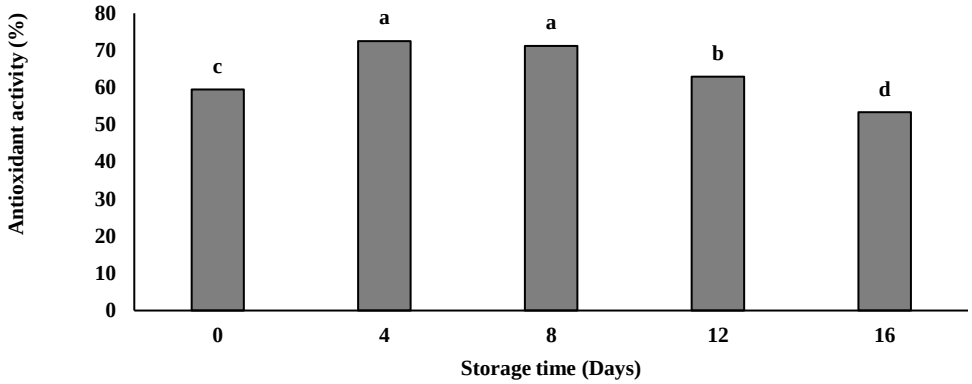
شکل ٦- اثر سینامیک اسید (CA) بر محتوای فنل کل قارچ دکمه‌ای در زمان‌های مختلف نگهداری.

میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد سه تکرار هستند.

Fig. 6. Effect of cinnamic acid (CA) on the total phenol content of button mushrooms at different storage times.
The vertical bars represent the standard deviation of three replications.

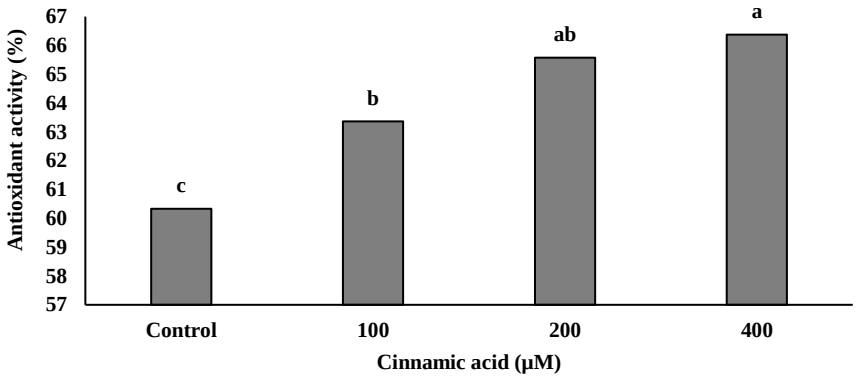
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

نتایج نشان داد که تنها اثرات اصلی زمان و سینامیک اسید در سطح یک درصد بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل معنی‌دار شد و اثر متقابل زمان× سینامیک اسید بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات اصلی زمان نشان داد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قارچ دکمه‌ای تا روز ۸ام آزمایش روند افزایشی داشت و پس از آن تا روز ۱۶ام به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۷). همه تیمارهای سینامیک اسید ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را نسبت به شاهد افزایش دادند و بیشترین تأثیر در تیمار سینامیک اسید ۴۰۰ میکرومولار مشاهده شد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را نسبت به شاهد ۱۱ درصد افزایش داد (شکل ۸).



شکل ۷- اثر زمان‌های مختلف نگهداری بر فعالیت آنتی اکسیدانی قارچ دکمه‌ای

Fig. 7. Effect of different storage times on the antioxidant activity of button mushrooms



شکل ۸- اثر سینامیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی قارچ دکمه‌ای

Fig. 8 Effect of cinnamic acid on the antioxidant activity of button mushrooms

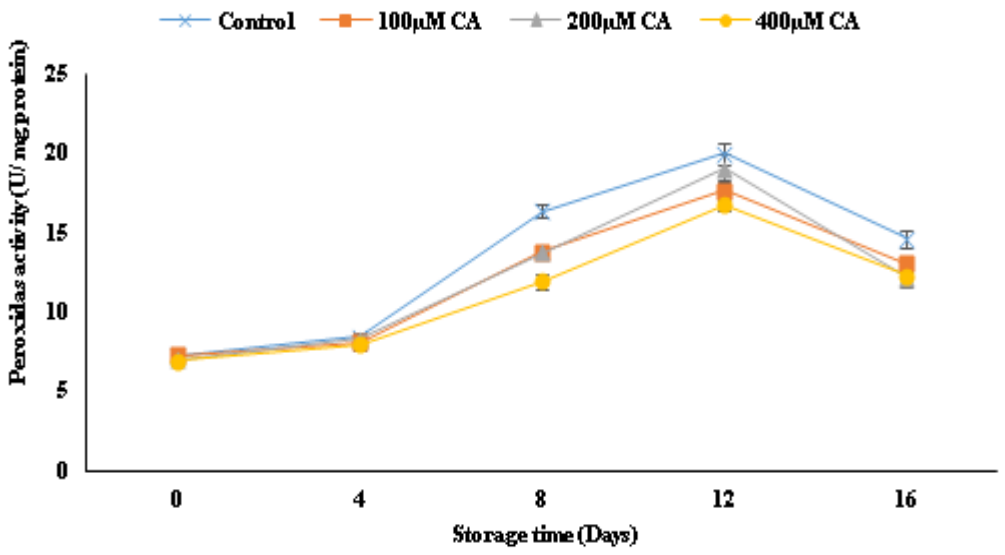
فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر تیمارهای زمان، سینامیک اسید و اثر متقابل آنها معنی‌دار شد (جدول ۱). در زمان‌های مختلف نگهداری فعالیت آنزیم پراکسیداز روند مشخصی نداشت به‌طوری که در روزهای صفر و ۴ام اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ولی پس از آن تا روز ۱۲ام افزایش و مجدداً روند کاهشی داشت. استفاده از تیمارهای سینامیک اسید در روزهای ۸، ۱۲ و ۱۶ فعالیت آنزیم پراکسیداز را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. هر سه غلظت سینامیک اسید (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) در کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز مؤثر بودند و بیشترین تأثیر آنها در روز ۸ام مشاهده شد (شکل ۹).

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی زمان و سینامیک اسید بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل زمان× سینامیک اسید بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل

اکسیداز معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش زمان نگهداری فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز روند افزایشی داشت و این روند در سطوح مختلف سینامیک اسید متفاوت بود. در زمان‌های مختلف آزمایش، به غیر از زمان‌های صفر و ۴ام، همه تیمارهای سینامیک اسید فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز را نسبت به شاهد کاهش دادند. غلظت ۴۰۰ میکرومولار سینامیک اسید موثرترین تیمار در کاهش فعالیت این آنزیم بود و در زمان‌های ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ به‌ترتیب ۲۸، ۵۰، ۱۹ و ۳۳ درصد فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز را نسبت به شاهد کاهش داد (شکل ۱۰).

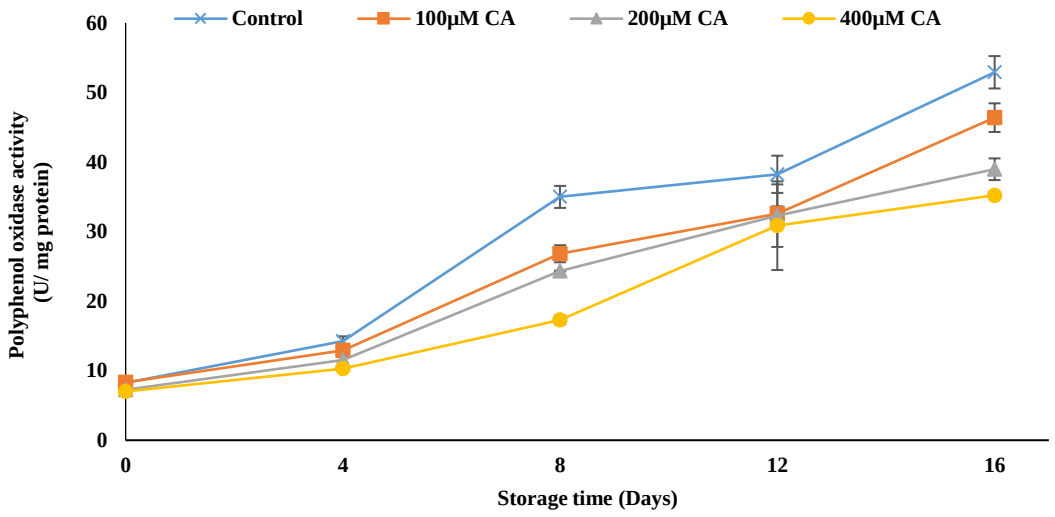


شکل ۹- اثر سینامیک اسید (CA) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز قارچ دکمه‌ای در زمان‌های مختلف نگهداری.

میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد سه تکرار هستند.

Fig. 9. Effect of cinnamic acid (CA) on peroxidase enzyme activity of button mushrooms at different storage times.

The vertical bars represent the standard deviation of three replications.



شکل ۱۰- اثر سینامیک اسید (CA) بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز قارچ دکمه‌ای در زمان‌های مختلف نگهداری.

میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد سه تکرار هستند.

Fig. 10. Effect of cinnamic acid (CA) on the polyphenol oxidase enzyme activity of button mushrooms at different storage times.

The vertical bars represent the standard deviation of three replications.

قارچ دکمه‌ای به دلایل قهوه‌ای شدن، پیری بافت، تنفس زیاد، از دست دادن رطوبت و حمله میکروب‌ها عمر پس از برداشت بسیار کوتاهی (کمتر از سه روز در دمای اتاق) دارد (Jiang et al., 2011). نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش زمان نگهداری، درصد کاهش وزن در قارچ دکمه‌ای به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. درصد کاهش وزن پارامتر کیفی بسیار مهمی است زیرا منجر به ضرر اقتصادی می‌شود (Jiang, 2013). دلیل کاهش وزن قارچ در دوره پس از برداشت از دست دادن آب می‌باشد زیرا قارچ‌ها دارای ساختار اپیدرمی بسیار نازک بوده که توانایی ممانعت از دفع سریع آب از بافت قارچ را ندارد (Jiang et al., 2011). بدیهی است که با کاهش رطوبت قارچ، کیفیت ظاهری آن نیز کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای Hu و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که کاربرد ترانس سینامیک اسید سبب کاهش درصد افت وزن در قارچ دکمه‌ای شد، که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (Hu et al., 2015). اثر سینامیک اسید در کاهش افت وزن قارچ در دوره پس از برداشت، احتمالاً به دلیل کاهش تنفس و کنترل واکنش‌های اکسیداسیون می‌باشد. از طرف دیگر نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از تیمار سینامیک اسید سبب کاهش پراکسید هیدروژن و همچنین کاهش تجمع مالون دی آلدهید شد. در این راستا گزارش شده است که استفاده از برازینولید در قارچ دکمه‌ای با حفظ یکپارچگی غشا سبب کاهش از دست دهی آب شد و کیفیت ظاهری آن را در دوره پس از برداشت حفظ کرد (Ding et al., 2016). پس بنابراین می‌توان گفت دلیل کاهش افت وزن در تیمار سینامیک اسید احتمالاً به دلیل حفظ یکپارچگی غشا باشد که می‌تواند روند اتلاف آب را کند کند.

یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار بر کیفیت قارچ دکمه‌ای قهوه‌ای شدن بافت است (Ding et al., 2016Jiang, 2013;). قهوه‌ای شدن بافت به دلیل اکسیداسیون ترکیبات فنلی توسط آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و در نتیجه تشکیل مواد قهوه‌ای رنگ ایجاد می‌شود. در واقع آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز اثر هم‌افزایی بر تشکیل پلیمرهای قهوه‌ای دارند (Gao et al., 2014). تأخیر یا کاهش قهوه‌ای شدن می‌تواند وسیله مهمی برای افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت قارچ دکمه سفید باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از تیمار سینامیک اسید سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در قارچ دکمه‌ای شد. به‌طور مشابه با این نتایج، Hu و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تیمار متوکسی سینامیک اسید تأثیر معنی‌داری در کاهش فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز در قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت دارد و قهوه‌ای شدن آنزیمی این محصول را کنترل می‌کند (Hu et al., 2015). در این راستا گزارش‌هایی از تأثیر مثبت تیمارهای شیمیایی برای کاهش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و در نتیجه حفظ کیفیت محصولات در دوره پس از برداشت موجود است. به‌عنوان مثال Gao و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که استفاده از برخی ترکیبات گیاهی مانند سینامالدئید فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز را مهار کرده و با کاهش قهوه‌ای شدن بافت و تأخیر پیری، ماندگاری قارچ دکمه‌ای را افزایش می‌دهد (Gao et al., 2014). همچنین، Jiang در سال ۲۰۱۳ نشان داد که پوشش آلژینات می‌تواند فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در قارچ دکمه‌ای سفید را در طول ذخیره سازی مهار کند و عمر پس از برداشت قارچ را تا ۱۶ روز در ۴ درجه سانتی‌گراد افزایش دهد (Jiang, 2013).

قهوه‌ای شدن آنزیمی با از بین رفتن یکپارچگی غشا در طی فرسایش بافت و پیری همراه است (Li-Qin et al., 2009). گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS)، مانند آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، نقشی اساسی در افزایش پراکسیداسیون لیپید و ایجاد آسیب اکسیداتیو غشا دارند (Singh et al., 2013). در واقع یکپارچگی غشا با پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تجمع مالون دی آلدهید رابطه منفی دارد (Morales and Munné-Bosch, 2019). نتایج تحقیق حاضر این مطلب را تأیید کرد به‌طوری که با افزایش زمان نگهداری قارچ در دوره پس از برداشت میزان پراکسید هیدروژن افزایش یافته و به موازات آن تجمع مالون دی‌آلدهید نیز روند مشابهی داشت. افزایش پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدهید قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (Yan et al., Ding et al., 2016; 2020). سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی توانایی محافظت از گیاه در برابر اثرات سمی ROS را دارند. در این رابطه گزارش شده است که تیمار سینامیک اسید سبب افزایش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاهان مختلف می‌شود و از این طریق تحمل آنها در برابر تنش‌های محیطی را افزایش می‌دهد (Li et al., 2011Singh et al., 2013;). در قارچ خوراکی نیز، تیمار متوکسی سینامیک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون شده و با کاهش تجمع آنیون سوپراکسید و مالون دی‌آلدهید فرآیندهای مرتبط با پیری را به تأخیر انداخت (Hu et al., 2015). نتایج این تحقیق نشان داد که قارچ‌های تیمار شده با سینامیک اسید میزان پراکسید هیدروژن کمتر و تجمع مالون دی‌آلدهید پایین‌تری نسبت به قارچ‌های شاهد داشتند. این نتایج ممکن است به دلیل اثر سینامیک اسید در فعال کردن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد (Singh et al., 2013). در تحقیق حاضر نیز تیمار سینامیک اسید ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را نسبت به شاهد افزایش داد. کاهش آسیب اکسیداتیو به ساختار غشا، محفظه آنزیم‌ها (پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز) و سوبسترا (ترکیبات فنلی) را

حفظ می‌کند و در نتیجه قهوه‌ای شدن آنزیمی را نیز کاهش می‌دهد (Chomkitichai et al. 2014).

ترکیبات فنلی به‌عنوان اصلی‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قارچ گزارش شده‌اند (Kalač, 2009). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تأثیرات مفیدی در حفظ سلامتی و پیشگیری از سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی دارند (Serafini, 2006). در تحقیق حاضر افزایش زمان نگهداری قارچ خوراکی منجر به کاهش فنل کل شده و به موازات آن ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نیز کاهش یافت. به طور مشابه، Jiang و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که با افزایش زمان نگهداری قارچ دکمه‌ای فنل کل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و به کمترین میزان خود در روز ۱۶ام نگهداری رسید (Jiang et al., 2011). به‌نظر می‌رسد که سطح کمتری از قهوه‌ای شدن بافت با محتوای ترکیبات فنلی رابطه مثبتی دارد و عامل محدودکننده روند تغییر رنگ قارچ در دوره پس از برداشت باشد (Gao et al., 2014). از طرف دیگر نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سینامیک اسید سبب افزایش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت شد. حفظ ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند تجمع رادیکال‌های آزاد داخل سلولی را کاهش داده و پیری محصول را به تأخیر بیندازد (Gao et al., 2016). در واقع پیش تیمار سینامیک اسید، صفات کیفی قارچ را در دوره نگهداری حفظ کرد. سینامیک اسید یک متابولیت ثانویه در مسیر فنیل پروپانوئید است و سایر ترکیبات فنلی در این مسیر از آن مشتق می‌شوند (Sharma et al., 2019). در بسیاری از گیاهان کاربرد سینامیک اسید سبب افزایش ترکیبات فنلی و خواص آنتی اکسیدانی شده است (Li et al., 2011Ye et al., 2006 ;). در قارچ خوراکی نیز پیش تیمار متوکسی سینامیک اسید ترکیبات آنتی اکسیدانی این محصول را نسبت به شاهد افزایش داد (Hu et al., 2015). این نتایج نشان می‌دهد که صفات کیفی قارچ خوراکی در دوره پس از برداشت با تیمار سینامیک اسید بهتر حفظ می‌شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج نشان داد که استفاده از تیمار سینامیک اسید باعث کاهش افت وزن، شاخص قهوه‌ای شدن، پراکسید هیدروژن، مالون دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت شد و از این طریق کیفیت ظاهری و برخی صفات کیفی قارچ دکمه‌ای مانند ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود داد. بنابراین استفاده از تیمار سینامیک اسید برای حفظ صفات کمی و کیفی قارچ دکمه‌ای در دوره پس از برداشت توصیه می‌شود.

منابع

1. Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. L. W. T. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. Free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, *30*(6), 609-615. https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240
2. Chomkitichai, W., Chumyam, A., Rachtanapun, P., Uthaibutra, J., & Saengnil, K. (2014). Reduction of reactive oxygen species production and membrane damage during storage of 'Daw'longan fruit by chlorine dioxide. *Scientia Horticulturae*, *170*, 143-149. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.02.036
3. Ding, Y., Zhu, Z., Zhao, J., Nie, Y., Zhang, Y., Sheng, J., & Tang, X. (2016). Effects of postharvest brassinolide treatment on the metabolism of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) in relation to development of browning during storage. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(8), 1327-1334. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1722-1
4. Gao, H., Zhang, Z. K., Chai, H. K., Cheng, N., Yang, Y., Wang, D. N., & Cao, W. (2016). Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *118*, 103-110. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.03.006
5. Gao, M., Feng, L., & Jiang, T. (2014). Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. *Food chemistry*, *149*, 107-113. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.073
6. Hu, Y. H., Chen, C. M., Xu, L., Cui, Y., Yu, X. Y., Gao, H. J., ... & Chen, Q. X. (2015). Postharvest application of 4-methoxy cinnamic acid for extending the shelf life of mushroom (Ag*aricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology*, *104*, 33-41. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.03.007
7. Hu, Y. H., Chen, Q. X., Cui, Y., Gao, H. J., Xu, L., Yu, X. Y., & Wang, Q. (2016). 4-Hydroxy cinnamic acid as mushroom preservation: anti-tyrosinase activity kinetics and application. International Journal of Biological Macromolecules, 86, 489-495. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.070
8. Jiang, T. (2013). Effect of alginate coating on physicochemical and sensory qualities of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) under a high oxygen modified atmosphere. *Postharvest biology and technology*, *76*, 91-97. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.09.005

9. Jiang, T., Zheng, X., Li, J., Jing, G., Cai, L., & Ying, T. (2011). Integrated application of nitric oxide and modified atmosphere packaging to improve quality retention of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Chemistry*, *126*(4), 1693-1699. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.060
10. Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry*, *113*(1), 9-16. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.077
11. Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant physiology, 57(2): 315-319. https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315
12. Li, Q., Yu, B., Gao, Y., Dai, A. H., & Bai, J. G. (2011). Cinnamic acid pretreatment mitigates chilling stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity. *Journal of plant physiology*, *168*(9), 927-934. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.025
13. Li-Qin, Z., Jie, Z., Shu-Hua, Z., & Lai-Hui, G. (2009). Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. *Food Chemistry*, *114*(1), 174-179. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.036
14. Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, *130*(4), 1036-1043. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127
15. Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant physiology*, *180*(3), 1246-1250. https://doi.org/10.1104/pp.19.00405
16. Ortiz-Ruiz, C. V., Maria-Solano, M. A., Garcia-Molina, M. D. M., Varon, R., Tudela, J., Tomas, V., & Garcia-Canovas, F. (2015). Kinetic characterization of substrate-analogous inhibitors of tyrosinase. *IUBMB life*, *67*(10), 757-767. **https://doi.org/10.1002/iub.1432**
17. Plewa, M. J., Smith, S. R., and Wagner, E. D. 1991. Diethyldithio carbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis, 247(1): 57-64. https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90033-K
18. Serafini, M. (2006). The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine*, *34*(12), 533-535. https://doi.org/10.1053/j.mpmed.2006.09.007
19. Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, *24*(13), 2452. **https://doi.org/10.3390/molecules24132452**
20. Shi, Y., Chen, Q. X., Wang, Q., Song, K. K., & Qiu, L. (2005). Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. Food Chemistry, 92(4), 707-712. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.031
21. Singh, P. K., Singh, R., & Singh, S. (2013). Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plants grown under salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *19*(1), 53-59. https://doi.org/10.1007/s12298-012-0126-6
22. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.
23. Stewart, R. R., & Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant physiology*, *65*(2), 245-248. https://doi.org/10.1104/pp.65.2.245
24. Yan, J., Ban, Z., Luo, Z., Yu, L., Wu, Q., Li, D., Zahedi, S, M., & Li, L. (2021). Variation in cell membrane integrity and enzyme activity of the button mushroom (*Agaricus bisporus*) during storage and transportation. *Journal of Food Science and Technology*, *58*(5), 1655-1662. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04674-1
25. Ye, S. F., Zhou, Y. H., Sun, Y., Zou, L. Y., & Yu, J. Q. (2006). Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt. *Environmental and Experimental Botany*, *56*(3), 255-262. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.02.010

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 277- 293

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۹۳-۲۷۷

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Full Research Paper

Optimization of subcritical water fluid extraction of phenolic compounds from pistachio hull: evaluation of radical scavenging properties of extracts

Morteza Mohammadi[1*], Mohammad Ghorbani[2], Alireza Sadeghi-Mahonak[2], Adel Beigbabaie[3], Samira Yeganehzad[4]

Received: 2021.01.18
Accepted: 2021.05.16

How to cite this article:
Mohammadi, M., Ghorbani, M., Sadeghi-Mahonak, A., Beigbabaie, A., Yeganehzad, S. (2022). Optimization of subcritical water fluid extraction of phenolic compounds from pistachio hull: evaluation of radical scavenging properties of extracts. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 277-293.

Abstract

Introduction: Phenolic compounds are known as a base of many functional foods due to their antioxidant properties and salutary effects. Phenolic compounds mainly found in plant sources. Agricultural wastes are one of the cheapest sources for getting phenolic compounds. Pistachio is considered one of the most important agricultural products in Iran. Study on the different parts of solid wastes generated from pistachio processing is worthy due to containing valuable compounds. On the other hand, using novel techniques such as supercritical CO_2, subcritical water, pulsed electric fields, etc., have gained more attention in the past few years. These technologies do not have side effects on the raw materials and final products; do not use chemical solvents such as hexane, methanol, acetonitrile, etc., in comparison to traditional extraction methods with the long time needed and using chemical solvents with hazardous effect on consumers. In this study, the subcritical water extraction method as a green technology was used for the extraction of phenolic compounds from pistachio hull using y response surface methodology.

Materials and Methods: In this study antioxidant properties of phenolic compounds extracted from pistachio hull by subcritical water fluid were evaluated. The extraction process is done at 120– 180 Celsius degree, pressure 10– 50 bar and ratio 1:10– 1:30 (sample to solvent) by using the subcritical water fluid method. The total phenolic compound, flavonoid compounds, reduction power, radical scavenging, and stability power of soybean edible oil were determined for each treatment. The stability power of extracts in soybean measured with rancimat test at 110 Celsius degree and airflow of 20 litter per minute. Comparison and statistical analysis for optimization of results accomplished using response surface methodology (RSM) by design expert software 7.0.0 version. After optimization, the results for optimum treatment were compared with BHT, ascorbic acid, and alpha-tocopherol. This comparison was done for reduction power, stability power, and radical scavenging ability.

Results and Discussion: The results showed that the total phenolic compounds changed from 7671.43 to 8903.57 mg Gallic acid equivalent per 100 g dry matter. Reduction power increased by increasing temperature from 120 to 150 Celsius degree and after that decreased. The effect of pressure on the phenolic compounds wasn't remarkable. The amount of flavonoid compound was between 142.87 and 290.21 mg equivalent catechin per 100 g dry material. The most effective parameter among investigated parameters (temperature, pressure, and ratio), was temperature. The pressure of extraction in subcritical water extractions did not have any significant effect and every change in laboratory results was very small.

1. Ph.D. Student of Food chemistry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
2. Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Assistant Professor, Food Chemistry Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST).
4. Assistant Professor, Food Processing Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST).
(*Corresponding Author Email: mohamadi2003@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68332.1009

The best results were observed at 147 Celsius degrees, pressure 10 bar, and 1:19 ratio. In these optimum conditions, the amount of total phenolic compounds, total flavonoid compounds, stability power, radical scavenging power, and reduction power was 2497.8 mg gallic acid per 100 g dry material, 267.99 mg flavonoid compounds catechin equivalent per 100 g dry material, 7.44 h, 1370.77 ppm, and 362.94 ppm respectively. Reduction and stability power with radical scavenging ability of pistachio hull extracts were very near to BHT as well as a synthetic antioxidant. Results showed that the extracts obtained from pistachio hull by subcritical water had high amount of phenolic compounds and had the same antioxidant properties as the synthetic antioxidant BHT.

Keyword: Subcritical water, Pistachio Hull, Novel technologies, agricultural wastes, flavonoid compounds, stability power.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 277- 293

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۹۳-۲۷۷

مقاله علمی-پژوهشی

بهینه‌سازی کاربرد سیال مادون بحرانی آب در فرآیند استخراج ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی از پوست پسته و بررسی ویژگی‌های رادیکال گیرندگی عصاره‌های آن

مرتضی محمدی[1*]- محمد قربانی[2]- علیرضا صادقی ماهونک[2]- عادل بیگ بابائی[3]- سمیرا یگانه‌زاد[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶

چکیده

ترکیبات فنولی به دلیل پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و اثرات سلامتی‌بخش بر سلامتی انسان به‌عنوان غذاهای فراویژه شناخته شده‌اند. در این پژوهش ترکیبات فنولی با استفاده از سیال مادون بحرانی آب، از پوست پسته استخراج و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. فرآیند استخراج در دمای ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، تحت فشارهای ۱۰ تا ۵۰ بار و نسبت اختلاط حلال ۱:۱۰ تا ۱:۳۰ (حلال به نمونه)، با استفاده از سیال مادون بحرانی آب انجام شد. مقدار ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت رادیکال گیرندگی و قدرت پایدارکنندگی در روغن سویا برای عصارهای استخراجی اندازه‌گیری شد. قدرت پایدارکنندگی عصاره‌ها در روغن سویا و با استفاده از آزمون اندازه‌گیری پایداری حرارتی، در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و جریان هوای ۲۰ لیتر بر ساعت صورت گرفت. مقایسه و تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از روش سطح پاسخ انجام گردید. نتایج نشان داد که مقدار ترکیبات فنولی از ۷۶۷۱/۴۳ تا ۸۹۰۳/۵۷ میلی‌گرم گالیک اسید در صد گرم نمونه در تغییر بود. قدرت احیاکنندگی از دمای ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و اثر فشار بر ترکیبات فنولی عصاره‌ها قابل توجه نبود. بهترین نتیجه در شرایط دمایی ۱۴۳ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۱۲ به‌دست آمد. قدرت احیاکنندگی آهن، قدرت پایدارکنندگی و جذب رادیکال‌های آزاد عصاره‌های استخراجی از پوست پسته مشابهت زیادی با آنتی اکسیدان سنتزی BHT داشت. نتایج حاکی از آن بود که کاربرد آب مادون بحرانی در استخراج ترکیبات موثره از پوست پسته تاثیر معنی‌داری در افزایش راندمان استخراج داشت و عصاره‌های استخراجی در مقایسه با روش سنتی از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: آب مادون بحرانی، پوست پسته، روش‌های نوین استخراج، ضایعات کشاورزی، ترکیبات فلاونوئیدی، پایدارسازی روغن خوراکی.

مقدمه

اکسیداسیون چربی‌ها در مواد غذایی، نگهداری آن‌ها را شدیدا کاهش داده و باعث می‌شود غذاهایی با کیفیت غیرقابل قبول به مشتری ارائه شود. پژوهش‌های زیادی برای یافتن پتانسیل آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌دست آمده از مواد مختلف کشاورزی (مانند پوست، ریشه، ساقه، برگ و میوه گیاهان) به‌عنوان جایگزینی برای ترکیبات سنتزی انجام شده است (Mohammadi *et al.*, 2019). تحقیق‌های انجام شده در این خصوص نشان داده است که ترکیبات پلی‌فنولی، آنتی اکسیدان‌های خوبی در برابر اکسیداسیون اولیه چربی‌ها در فسفولیپیدها و سیستم‌های بیولوژیکی هستند (Braud *et al.*, 2017). این موضوع عموما پذیرفته شده که تنش اکسایشی به‌وسیله گروه‌های مختلف اکسیژن فعال شده (ROS)[5] مانند رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل و متوکسیل، ایجاد می‌شود (Akhtar *et al.*, 2017).

یکی از محصولات کشاورزی استراتژیک ایران، پسته می‌باشد که در مقیاس بسیار وسیعی در مناطق مختلف ایران کشت و کار می‌شود، به‌گونه‌ای که ایران با تولید ۲۱۰ هزار تن پسته طی سال آبی ۲۰۱۵ -۲۰۱۴، همچون سال‌های قبل از آن، بزرگترین تولیدکننده این محصول در سطح دنیا بوده است (USDA, 2015). Rajaei و همکاران

۱- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۲- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۳- استادیار، گروه شیمی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، کیلومتر ۱۲ جاده قوچان، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی
۴- استادیار، گروه فراوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، کیلومتر ۱۲ جاده قوچان، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی
(* - نویسنده مسئول: Email: mohamadi2003@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68332.1009
5 Reactive Oxygen Species (ROS)

(۲۰۱۰) بیان نمودند که ترکیبات استخراج شده از پوست پسته دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی خوبی می‌باشد (Rajaei *et al.*, 2010).

تاکنون استفاده از حلال‌های آلی بیشترین دامنه کاربرد را در استخراج ترکیبات موثره از منابع طبیعی داشته است. اما روش‌های معمول استخراج بر پایه حلال‌های آلی ممکن است اثرات نامطلوبی بر محیط زیست و مواد غذایی داشته باشد. از این‌رو اخیرا تکنولوژی سبز مورد توجه قرار گرفته است. استخراج به‌وسیله سیال مادون بحرانی[1] (SCW) به‌عنوان یک روش استخراج، از آب به‌عنوان حلال، استفاده می‌کند. تحت شرایط مادون بحرانی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب تغییر کرده و قابلیت آن برای استخراج مجموعه‌ای از ترکیبات زیست فعال افزایش می‌یابد (Al-Dabbas *et al.*, 2006). آب در محدوده دمایی ۱۰۰ تا ۳۷۴ درجه سانتی‌گراد و تحت فشار مورد نیاز برای باقیماندن در فاز مایع، به یک سیال مادون بحرانی تبدیل می‌شود (Ahmadian-Kouchaksaraie *et al.*, 2016). تحت این شرایط باندهای هیدروژنی ضعیف و سست شده، قطبیت آب به مقدار قابل توجهی کاهش یافته و ثابت یونیزاسیون آب (K_w) افزایش می‌یابد (Ayala and Luke, 2001; Tilahun and Chun, 2017). Ahmadian-Kouchaksaraie و همکاران (۲۰۱۶)، ترکیبات فنولی موجود در گلبرگ زعفران را توسط آب مادون بحرانی استخراج نمودند (Ahmadian-Kouchaksaraie *et al.*, 2016). Maghsoudlou و همکاران (۲۰۱۶) بیان نمودند روش استخراج توسط آب مادون بحرانی در مقایسه با امواج فراصوت دارای قابلیت بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها از انجیر می‌باشد (Maghsoudlou *et al.*, 2016).

با توجه به اینکه پسته تازه برداشت شده، حدودا دارای ۲۰٪ پوست می‌باشد که پس از برداشت به‌وسیله ماشین‌های پوست‌کن از آن جدا شده و در اغلب موارد دور ریخته شده و در معدود مواردی نیز به مصرف خوراک دام می‌رسد، به‌نظر می‌رسد که مطالعه روی میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و زیست‌فعال این بخش از محصول پسته می‌تواند افق‌های جدیدی را در تولید و بهره برداری بیشتر در مورد پسته ایجاد نماید. هدف از انجام این پژوهش اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولی و بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست آمده از پوست پسته و بهینه‌سازی فرآیند استخراج تحت شرایط مادون بحرانی، به‌منظور رسیدن به عصاره‌ای با بیشترین مقدار ترکیبات فنولی کل، حداکثر قدرت رادیکال گیرندگی، احیاکنندگی و پایدارکنندگی روغن سویا بود.

مواد و روش‌ها

آزمایشات در آزمایشگاه فناوری‌های نوین موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی و در سال ۲۰۲۲ انجام شد. با توجه به اینکه محصول پسته از ابتدای مرداد ماه تا پایان مهر ماه برداشت می‌شود، پوست پسته از باغات استان خراسان رضوی، شهرستان سبزوار، تهیه شد. روغن سویای فاقد آنتی‌اکسیدان از شرکت سه گل نیشابور تهیه و سایر مواد اولیه و معرف‌های شیمیایی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

خشک کردن پوست پسته

پوست‌های پسته تازه جمع‌آوری شده و به‌صورت سایه- خشک، خشک و تا زمان مصرف نگهداری گردید. پس از آن پوست‌های پسته، توسط آسیاب آزمایشگاهی (T- 8300، ایران) کاملا خرد و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند (Mohammadi et al., 2019).

عصاره‌گیری

مقدار مورد نیاز توسط ترازوی آزمایشگاهی (A&D، N92 D0001، ژاپن) با دقت ۰/۰۱ گرم توزین و درون توری‌هایی از جنس استیل با مش ۱۰۰۰ ریخته و کاملا بسته و درون مخزن دستگاه قرار داده شد. حجم مورد نیاز از حلال با توجه به نسبت اختلاط، درون مخزن ذخیره دستگاه[2] ریخته و هیتر دستگاه برای تامین درجه حرارت مورد نیاز روشن شد. همزمان پمپ فشار بالا نیز روشن و روی فشارهای مورد نیاز تنظیم گردید. عصاره‌گیری از پوست پسته در دماهای ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، فشارهای ۱۰ تا ۵۰ بار و نسبت احتلاط‌های ۱:۱۰ تا ۱:۳۰ به‌وسیله دستگاه استخراج‌کننده مادون بحرانی آب طراحی و ساخته شده در آزمایشگاه فناوری‌های نوین موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی انجام شد.

بعد از اتمام استخراج، عصاره تهیه شده در اولین مرحله، توسط پارچه متقال و در مرحله دوم توسط کاغذ صافی و پمپ خلا (Buchi B-169، سوئیس) صاف شد. عصاره صاف شده ابتدا توسط تبخیرکننده دوار تحت خلا (Buchi B-480، سوئیس)، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد غلیظ و عصاره تغلیظ شده در آون خلا (Hearus، آلمان) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد. عصاره خشک شده از کف پلیت‌ها تراشیده و درون شیشه‌های دربدار که توسط فویل آلومینیومی در برابر نفوذ نور محافظت شده بودند، تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Mohammadi et al., 2019).

1 Subcritical Water

2 Balance Tank

تعیین مقدار کل ترکیبات فنولی به روش فولین سیوکالتو

غلظت مناسبی از عصاره‌های استخراجی تهیه و ۰/۵ میلی‌لیتر از آن‌ها به همراه ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ۱۰ بار رقیق شده در آب مقطر، به لوله‌ها منتقل و در نهایت ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در پایان جذب نمونه، در سل‌های یک سانتی‌متری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu160 A, UV-Visible Recording، ژاپن) در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. برای نمونه شاهد از ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. آزمون برای هر نقطه با سه تکرار انجام شد. در پایان مقدار کل ترکیبات فنولی (TPC) بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در صد گرم نمونه خشک پوست پسته محاسبه گردید (Kulisic *et al.*, 2004).

تعیین قدرت احیاکنندگی

۲/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به لوله‌های آزمایش درب‌دار منتقل و بعد از آن ۲/۵ میلی‌لیترمحلول بافر فسفات (pH= ۶/۶، ۰/۲ مولار) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد، به لوله‌ها اضافه و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه درون بن ماری (Memmert 350، آلمان) ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن بلافاصله در آب ۴ درجه سانتی‌گراد، خنک و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید، به لوله‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ (Hettich–EBA 2، آلمان) ۳۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفوژ شد. ۵ میلی لیتر از محلول بالایی توسط ۵ میلی لیتر آب مقطر رقیق و پس از آن ۱ میلی لیتر محلول فریک کلراید ۰/۱ درصد به لوله اضافه و تکان داده شد و در پایان جذب آن در ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید. این آزمایش با سه تکرار انجام شد (Maghsoudlou *et al.*, 2016). برای اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی (RP)، از مقدار عددی EC_{50}[1] که برابر است با غلظت مورد نیاز برای به‌دست آمدن جذب ۵۰ درصد، استفاده شد. هرچه مقدار EC_{50} کمتر باشد، نشان از قدرت بیشتر عصاره در احیا آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی می‌باشد. از BHT و اسید آسکوربیک به‌عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد.

آزمون پایدارکنندگی

به‌منظور پایداری اکسایشی روغن، از دستگاه رنسیمت (Metrohm 743، آمریکا) استفاده شد. در این روش از شرایط تشدید شده اکسایش مانند دمای بالا و جریان هوا استفاده می‌شود. روش کار به این صورت بود که غلظت ثابت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره‌ها در آب، به کمک ماده حد واسط پروپیلن گلایکول که در صنعت روغن به‌منظور توزیع BHT در روغن کاربرد دارد، در روغن سویای تصفیه، بوگیری و رنگبری شده بدون آنتی‌اکسیدان، تهیه و ۴ گرم از نمونه آماده شده به درون لوله‌های مخصوص دستگاه منتقل شد. پس از آن لوله‌ها در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و با شدت جریان هوای ۲۰ لیتر بر ساعت، درون دستگاه قرار گرفتند. زمان لازم، بر حسب ساعت، برای رسیدن روغن به شرایط اکسید شده تحت عنوان دوره القا[2] بیان گردید (Yang *et al.*, 2016). به‌منظور مقایسه بهتر از BHT به‌عنوان آنتی‌اکسیدان سنتزی و آلفاتوکفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت پایداری روغن سویا استفاده شد.

اندازه‌گیری قدرت رادیکال گیرندگی

قدرت رادیکال‌گیرندگی (RSA) عصاره‌های استخراجی با استفاده از روش توصیف شده توسط Shaddel و همکاران (۲۰۱۴)، با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد (Shaddel *et al.*, 2014). در این روش ۰/۰۰۲ گرم از DPPH در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شد به‌طوریکه جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ nm، بین ۰/۹ –۱ باشد. ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی به همراه ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH به لوله‌های آزمایش منتقل و پس از ۳۰ دقیقه، جذب محلول نهایی در طول موج ۵۱۷ nm قرائت گردید. از متانول به‌عنوان شاهد استفاده شد. جذب‌های به‌دست آمده با استفاده از رابطه ۱ به درصد توانایی جذب رادیکال[3] تبدیل و در ترسیم منحنی‌های رادیکال گیرندگی استفاده شدند.

$$RSA\% = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100 \qquad (۱)$$

که در آن $Abs_{control}$ جذب نمونه شاهد و Abs_{sample} جذب نمونه می‌باشد. برای مقایسه قدرت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی، از فاکتور IC_{50} که برابر است با غلظت موثر برای جذب ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط، استفاده شد. برای مقایسه بهتر از BHT و اسید آسکوربیک بهره گرفته شد.

اندازه‌گیری محتوای کل فلاونوئیدی

اندازه‌گیری محتوای کل فلاونوئیدی بر اساس ایجاد ترکیبات رنگی آلومینیوم کلراید در حضور ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. یک گرم از پوست پسته پودر شده با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی شده توسط HCl (۱ درصد V/V) مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ

1 Efficient Concentration
2 Induction Period
3 Radical Scavenging Ability (RSA %)

و محلول بالایی در روش رنگ‌سنجی مورد استفاده قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از محلول با ۴ میلی‌لیتر با رقیق و با ۰/۳ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد $NaNO_2$ مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق باقیماند. پس از آن ۰/۶ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید (III) ۶ آبه ($AlCl_3.6H_2O$) به محلول اضافه و به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق ماندن، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۱ مولار NaOH به آن اضافه و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. جذب محلول نهایی در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت و نتایج با استفاده از نمودار استاندارد بر مبنای میلی‌گرم کاتچین در ۱۰۰ گرم ماده خشک بیان شد (Talebi et al., 2020).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بهینه‌سازی فرآیند استخراج عصاره از پوست پسته، به‌وسیله سیال مادون بحرانی آب با روش سطح پاسخ، بر پایه طرح مرکب مرکزی با سه فاکتور، که از بیست آزمایش با شش نقطه مرکزی تشکیل شده بود، صورت گرفت. متغیرهای مستقل عبارت بودند از دمای استخراج (x_1, °C)، فشار (x_2, bar) و نسبت اختلاط نمونه و حلال (x_3). طراحی آزمایش‌ها و آنالیز واریانس به‌وسیله نرم افزار Design Expert نسخه ۷ در سطح احتمال α=۰/۰۵ انجام شد. علاوه بر آن رفتار متغیرهای مورد مطالعه در این تحقیق، با توجه به مدل‌های برازش داده شده، در جهت رسیدن به بهترین شرایط مورد نظر، بهینه‌سازی شدند.

نتایج و بحث

انتخاب مدل نتایج به‌دست آمده

مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای مقدار ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی روغن و قدرت رادیکال گیرندگی، در برازش داده‌ها نسبت به سایر مدل‌های پیشنهادی، اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱- انتخاب مدل برای مقادیر ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی، قدرت رادیکال گیرندگی و ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌های استخراجی

Table 1- Model selection for the TPC, reducing power, stability power, radical scavenging ability, and total flavonoid compounds of extracts

	منبع Source	عرض از مبدا	خطی	مدل: چندجمله‌ای ساده	چندجمله‌ای درجه دوم	چندجمله‌ای درجه سوم	کل	باقیمانده	باقیمانده
	درجه آزادی	1	3	3	3	4	20	6	6
ترکیبات فنولی TPC (mg G.A/100 g d.m)	مجموع مربعات	1.06×10^8	1883933	172893.1	172077.8	17637.93	1.09×10^8	17040.9	17040.9
	F Value		26.46556	3.6236	16.54014	1.552553			
	p-value		< 0.0001	0.0424	0.0003	0.2997			
قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm)	مجموع مربعات	2254824	7376.078	696.9947	10850.03	713.4411	2274817	357.3506	357.3506
	F Value		3.117742	0.253364	33.77572	2.994711			
	p-value		0.0555	0.8576	< 0.0001	0.1115			
قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	مجموع مربعات	959.251	11.76738	0.686138	0.224725	0.13802	972.3817	0.314433	0.314433
	F Value		46.03438	4.390669	1.655607	0.658424			
	p-value		< 0.0001	0.0242	0.2387	0.6428			
قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)	مجموع مربعات	2.09×10^7	1694809	430198.7	497793.9	8740.013	1.51×10^8	4150.267	4150.267
	F Value		9.606916	3.650386	128.7259	3.158838			
	p-value		0.0007	0.0416	< 0.0001	0.1013			
فلاونوئیدهای کل Total Flavonoid (mg Cat/100g d.m)	مجموع مربعات	9.31×10^5	5224.40	2909.86	10333.43	4861.97	9.58×10^5	3336.34	3336.34
	F Value		1.30	0.68	4.20	2.19			
	p-value		0.31	0.58	0.04	0.19			

جدول ۲- آنالیز واریانس پارامترهای ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی، قدرت رادیکال گیرندگی و ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌های استخراجی (ANOVA).

Table 2- Analysis of variance of the parameters of TPC, reducing power, stability power, radical scavenging ability, and total flavonoid compounds of extracts (ANOVA)

	منبع	عرض از مبدا	دما-A	فشار-B	نسبت C-اختلاط	AB	AC	BC	A^2	B^2	C^2	باقیمانده	فقدان برازش	خطای خالص
	درجه آزادی	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	5	5
ترکیبات فنولی TPC (mg G.A/100 g d.m)	مجموع مربعات	2228904	95329.56	7562.5	1781041	-	-	166340.9	44135.24	129110.7	53342.73	34678.83	22615.97	12062.85
	F Value	71.41418	27.48927	2.180725	513.5817	-	-	47.96612	12.72685	37.23042	15.38193		1.874844	
	p-value	< 0.0001	0.0004	0.1705	< 0.0001	ns	ns	< 0.0001	0.0051	0.0001	0.0029		0.2535	
قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm)	مجموع مربعات	18923.1	4645.643	1352.912	1377.523	-	649.1489	-	9800.94	193.573	4394.258	1070.792	724.7604	346.0313
	F Value	19.63563	43.38512	12.63469	12.86453	-	6.062326	-	91.52985	1.807756	41.03747		2.094494	
	p-value	< 0.0001	< 0.0001	0.0052	0.0050	ns	0.0336	ns	< 0.0001	0.2085	< 0.0001		0.2182	
قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	مجموع مربعات	13.33	9.84	1.35	1.27	-	0.08	0.15	0.41	0.26	-	0.12	0.05	0.07
	F Value	121.82	809.04	111.34	104.19	-	6.39	12.15	33.67	21.01	-		0.67	
	p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	0.03	0.005	0.0002	0.001	ns		0.6614	
قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)	مجموع مربعات	2622802	502206.2	404024.4	788578.6	88085.77	82799.24	259313.7	142632.2	160030	144135.1	12890.28	8771.991	4118.289
	F Value	226.0792	389.6007	313.4334	611.7622	68.33503	64.23386	201.17	110.651	124.1478	111.8169		2.130009	
	p-value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001		0.2131	
فلاونوئیدهای کل Total Flavonoid (mg Cat/100g d.m)	مجموع مربعات	18467.70	918.34	-	4019.62	-	-	-	4500.47	-	1781.75	8198.31	5015.35	3182.96
	F Value	2.50	1.12	-	4.90	-	-	-	5.49	-	2.17		1.58	
	p-value	<0.001	<0.001	ns	0.05	ns	ns	ns	0.04	ns	0.01		0.31	

جدول ۳- مشخصات آماری مدل‌های منتخب برای مقادیر ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی، قدرت رادیکال گیرندگی و ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌های استخراجی

Table 3- Statistical characteristics of selected models for the values of TPC, reducing power, stability power, radical scavenging ability, and total flavonoid compounds of extracts

	ترکیبات فنولی TPC (mg G.A/100 g d.m)	قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm)	قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)	فلاونوئیدهای کل Total Flavonoid (mg Cat/100g d.m)
انحراف معیار	58.88873	10.34791	0.212709	35.90304	28.63
میانگین	2305.616	335.7695	6.9255	2721.284	215.80
ضریب تغییرات	2.554144	3.081848	3.071393	1.319342	13.27
R^2	0.98468	0.946444	0.965542	0.995109	0.70
Adj. R^2	0.970891	0.898244	0.934531	0.990708	0.68

مدل مناسب با توجه به معنی دار بودن آزمون F (P<0.05) و معنی دار نبودن مقدار فقدان برازش[۱۲] (P>0.05) در مورد آن و همچنین مقادیر R^2، R^2adj و ضریب تغییرات[۱۳] (CV) انتخاب شد. معادله کلی چندجمله‌ای درجه دوم به‌صورت زیر قابل ارائه می‌باشد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} . x_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=2}^{3} \beta_{ij} x_i . x_j \quad (۲)$$

که در آن Y، مقدار پاسخ به‌دست آمده، β_0، β_i، β_{ii} و β_{ij}، به‌ترتیب ضرایب معادله رگرسیونی برای عرض از مبدا، حالت خطی، درجه دوم و اثرمتقابل متغیرهای مستقل دما، فشار استخراج و نسبت اختلاط می باشد. با توجه به جدول ۳ و مقادیر بالای ضریب تبیین به‌دست آمده، شاهد برازش مناسب داده‌ها توسط مدل‌های انتخابی بودیم. مقدار ضریب تبیین برای ترکیبات فنولی کل، قدرت احیاکنندگی، قدرت پایدارکنندگی روغن و قدرت رادیکال گیرندگی، به‌ترتیب ۰/۹۸، ۰/۹۵، ۰/۹۶ و ۰/۹۹ بود. ضریب تغییرات بسیار پایین نیز دلیل دیگری بر این مدعاست که مدل چندجمله‌ای درجه دوم، برازش مناسبی از داده‌های حاصل از کار آزمایشگاهی داشت. پارامترهای موثر در مدل‌های به‌دست آمده با توجه به آنالیز واریانس انجام شده و جدول آنالیز واریانس (ANOVA)، انتخاب و در مدل نهایی جایگذاری شدند.

بررسی میزان ترکیبات فنولی کل

با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول ۲) تمامی پارامترهای خطی و درجه دوم دما، فشار و نسبت اختلاط نمونه و حلال، به همراه پارامتر اثرمتقابل فشار و نسبت اختلاط نمونه و حلال، در معادله برازش داده شده برای مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته، دارای اثر معنی‌داری بودند (P<0.05) (جدول ۲). مدل برازش داده شده با توجه به آنالیز آماری انجام شده مطابق با معادله ۳ می‌باشد:

$$Y= 2330.26+ 9764b_1+ 27.5b_2+ 422.02b_3- 126.68b_{11}+ 216.68b_{22}- 139.27b_{33}+ 144.20b_{23} \quad (۳)$$

بررسی تغییرات دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد بر میزان ترکیبات فنولی کل نشان داد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته افزایش یافت و با افزایش دما از ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، میزان ترکیبات فنولی کاهش یافت. با افزایش فشار از ۱۰ تا ۳۰ بار، میزان ترکیبات فنولی کاهش کمی داشت اما با افزایش فشار از ۳۰ تا ۵۰ بار، میزان ترکیبات فنولی افزایش داشت (شکل ۱-الف).

ثابت دی‌الکتریک آب در دماهای ۸۰، ۱۱۰ و ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب ۸۱، ۵۳ و ۴۲ اپسیلون (ε) می‌باشد (Kerr and Lide, 2000) و این باعث می‌شود که با افزایش دما تا دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، انحلال ترکیبات فنولی موجود در پوست پسته که خاصیت نیمه قطبی دارند، در آب مادون بحرانی با دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد.

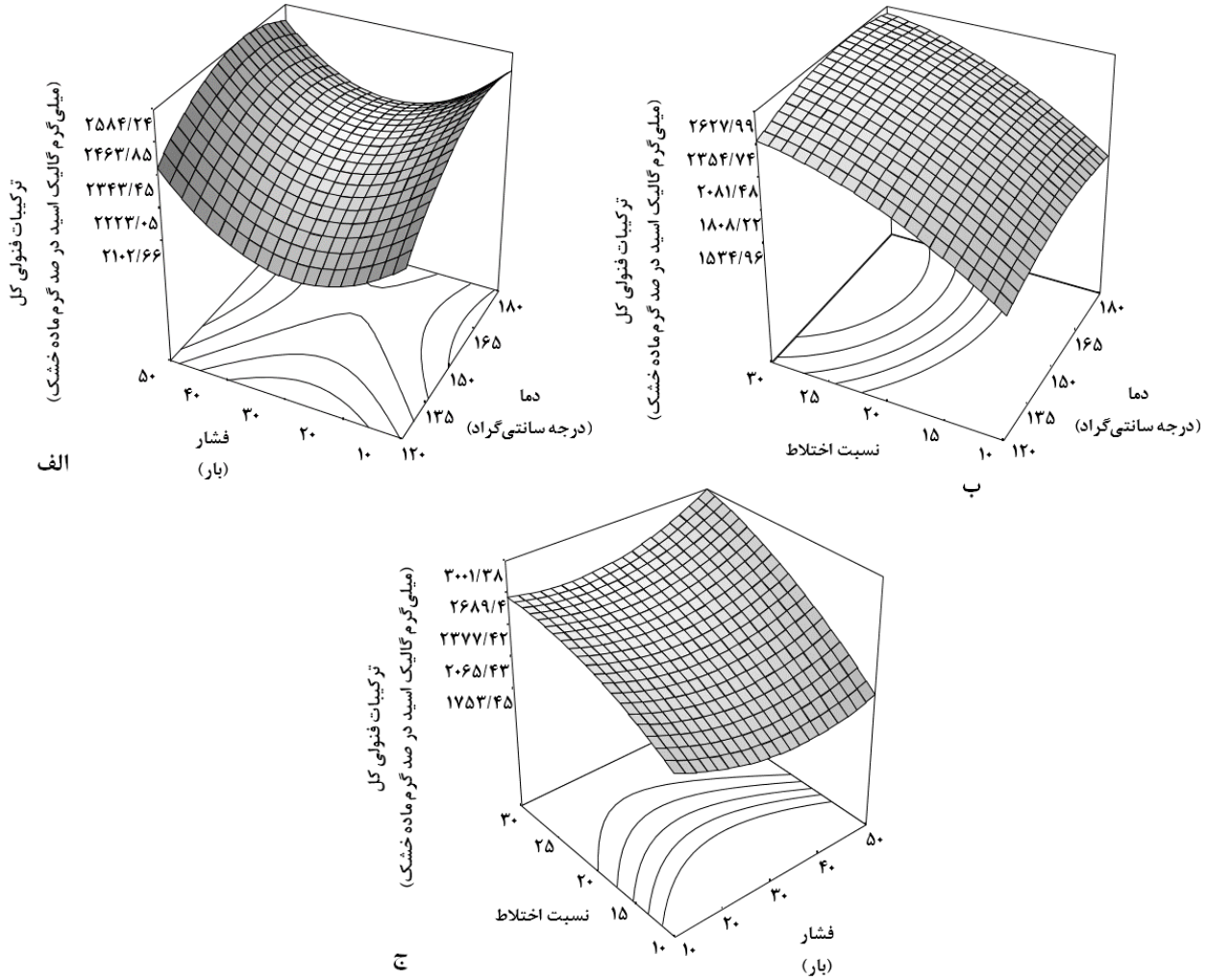
بررسی اثر متقابل دما و نسبت اختلاط نمونه و حلال، بر میزان ترکیبات فنولی استخراج شده نشان داد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، مقدار ترکیبات فنولی افزایش یافت و با افزایش نسبت اختلاط ۱:۱۰ تا ۱:۳۰، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده به‌صورت محسوسی افزایش داشت. با توجه به شکل ۱ب میزان اثر بخشی نسبت اختلاط حلال و نمونه در افزایش مقدار ترکیبات فنولی بسیار بیشتر از اثر افزایش دما بوده است. این نتایج با نتایج گزارش شده توسط He و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت که بیان نمودند با افزایش نسبت

1 Lack of fit

2 Correlation value

اختلاط از ۱:۱۰ تا ۱:۴۰، میزان ترکیبات فنولی افزایش یافت (He *et al.*, 2011).

افزایش دمای آب موجب کاهش ویسکوزیته و کشش سطحی آب شده و منجر به افزایش نرخ نفوذ و بالا رفتن میزان انتقال جرم می‌شود (Ramos *et al.*, 2002). با بررسی اثر متقابل فشار و نسبت اختلاط نمونه و حلال مشخص شد که در اینجا نیز اثر افزایش نسبت اختلاط بسیار بیشتر از اثر افزایش فشار در استخراج ترکیبات فنولی از پوست پسته بوده است. با افزایش نسبت اختلاط از ۱:۱۰ تا ۱:۳۰، میزان ترکیبات فنولی همواره افزایش داشته است. افزایش فشار هرچند که باعث افزایش استخراج ترکیبات فنولی شد اما افزایش چشمگیر و محسوسی نبوده است (شکل ۱ج). هرچند که افزایش دما باعث نرم شدن بافت مواد می‌شود اما در هم‌گسیختگی بین ترکیبات فنولی و پلی ساکاریدها یا پروتئین‌ها باعث کاهش میزان ترکیبات فنولی در دماهای بالاتر از ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد شده است (Shi *et al.*, 2003). همچنین افزایش احتمال از هم گسیختگی دمایی ترکیبات فنولی در دماهای بالاتر از ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد نیز ممکن است از دلایل کاهش میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی در دماهای ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد باشد (Ahmadian-Kouchaksaraie *et al.*, 2016).



شکل ۱- اثر متقابل پارامترهای دما – فشار (الف)، دما– نسبت اختلاط (ب) و فشار– نسبت اختلاط (ج) بر مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی.

Fig. 1. Interaction of temperature-pressure (a), temperature-mixing ratio (b) and pressure-mixing ratio (c) on the TPC of pistachio hull extracts by subcritical water.

نتایج این مطالعه با نتایج به‌دست آمده به‌وسیله Ahmadian-Kouchaksaraie و همکاران (۲۰۱۶) که روی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از گلبرگ زعفران به‌وسیله سیال مادون بحرانی آب مطالعه نمودند، مطابقت داشت. بیشترین میزان ترکیبات فنولی از گلبرگ

زعفران در دمای ۱۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد (Ahmadian-Kouchaksaraie *et al.*, 2016). نتایج مشابهی نیز در استخراج ترکیبات فنولی از برگ‌های سنجد به‌دست آمد که در آن بهترین دما برای استخراج ترکیبات فنولی، دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Kumar *et al.*, 2011).

از طرف دیگر دمای بهینه استخراج ترکیبات فنولی، با توجه به نوع ماده اولیه و بافت آن متغیر می‌باشد. به‌عنوان مثال بیشترین میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از دانه انار به‌وسیله آب مادون بحرانی، در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد (He *et al.*, 2011). Rajaei و همکاران (۲۰۱۰) بیان نمودند که بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنولی از پوسته پسته به‌روش سنتی، آب می‌باشد که بیشترین مقدار ترکیبات فنولی را به میزان ۵۰ میلی‌گرم ترکیب فنولی در هر گرم ماده خشک توانستند با استفاده از آب استخراج نمایند (Rajaei *et al.*, 2010).

بررسی قدرت احیاکنندگی آهن

مدل برازش داده شده با استفاده از داده‌های حاصل از کار آزمایشگاهی برای قدرت احیاکنندگی آهن، توسط عصاره‌های استخراج شده، مطابق با رابطه ۴ می‌باشد. بیشترین اثر در این مدل مربوط به پارامتر درجه دوم دما و کمترین اثر به پارامتر اثر متقابل دما و نسبت اختلاط مربوط بود.

$$Y= 341.43- 21.55b_1- 11.63b_2+ 11.74b_3- 59.70b_{11}+ 39.97b_{33}+ 9.01b_{13} \quad (۴)$$

یکی از خواص آنتی‌اکسیدانی که معمولا مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، قدرت احیا یون‌های آهن سه ظرفیتی (Fe^{+3}) به آهن دو ظرفیتی (Fe^{+2}) توسط عصاره‌های استخراجی می‌باشد. در این روش یون‌های آهن در حضور معرف مورد استفاده رنگ سبز ایجاد می‌نماید (Jayaprakasha *et al.*, 2001). افزایش فشار از ۱۰ تا ۵۰ بار تغییر چندانی در قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست سبز پسته نداشت. اما افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش قدرت احیاکنندگی و با افزایش دما از ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، قدرت احیاکنندگی به‌صورت چشمگیری کاهش یافت. این نتایج با تغییرات میزان ترکیبات فنولی مطابقت داشت در مطالعه انجام شده توسط Pintoa و همکاران (۲۰۲۱) عنوان شد پارامتر دما موثرترین عامل در تغییر قدرت احیاکنندگی آهن، توسط عصاره‌های استخراجی بود (Pintoa et al., 2021).

با توجه به شکل ۲ الف، با افزایش نسبت اختلاط از ۱:۱۰ تا ۱:۲۰ قدرت احیاکنندگی کاهش و با افزایش نسبت اختلاط از ۱:۲۰ تا ۱:۳۰ شاهد افزایش قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراجی بودیم. این روند در تمامی دماهای مورد مطالعه مشاهده شد. بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت اختلاط ۱:۳۰ مشاهده شد.

با بررسی اثر متقابل نسبت اختلاط و فشار بر قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراجی شاهد اثر ناچیز متغیر فشار در قدرت احیاکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته بودیم. این اثر در تمامی نسبت اختلاط‌های مورد مطالعه مشاهده شد (شکل ۲ ج). مقادیر به‌دست آمده برای قدرت احیاکنندگی آهن به‌وسیله عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی، با قدرت احیاکنندگی آهن توسط اسید آسکوربیک و BHT نیز مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که اختلاف چندانی میان قدرت احیاکنندگی عصاره بهینه و آنتی اکسیدان BHT وجود نداشت و بالاترین قدرت احیاکنندگی آهن به اسید آسکوربیک مربوط بود (جدول ۵). Rodrigues و همکاران (۲۰۲۰) که بر روی استخراج ترکیبات زیست فعال گیاه چایا با استفاده از روش مادون بحرانی و مایکروویو مطالعه نمودند بیان داشتند که عصاره به‌دست آمده از روش مایکروویو، قدرت بیشتری در جذب یون‌های آهن دارا بودند (Rodrigues et al., 2020).

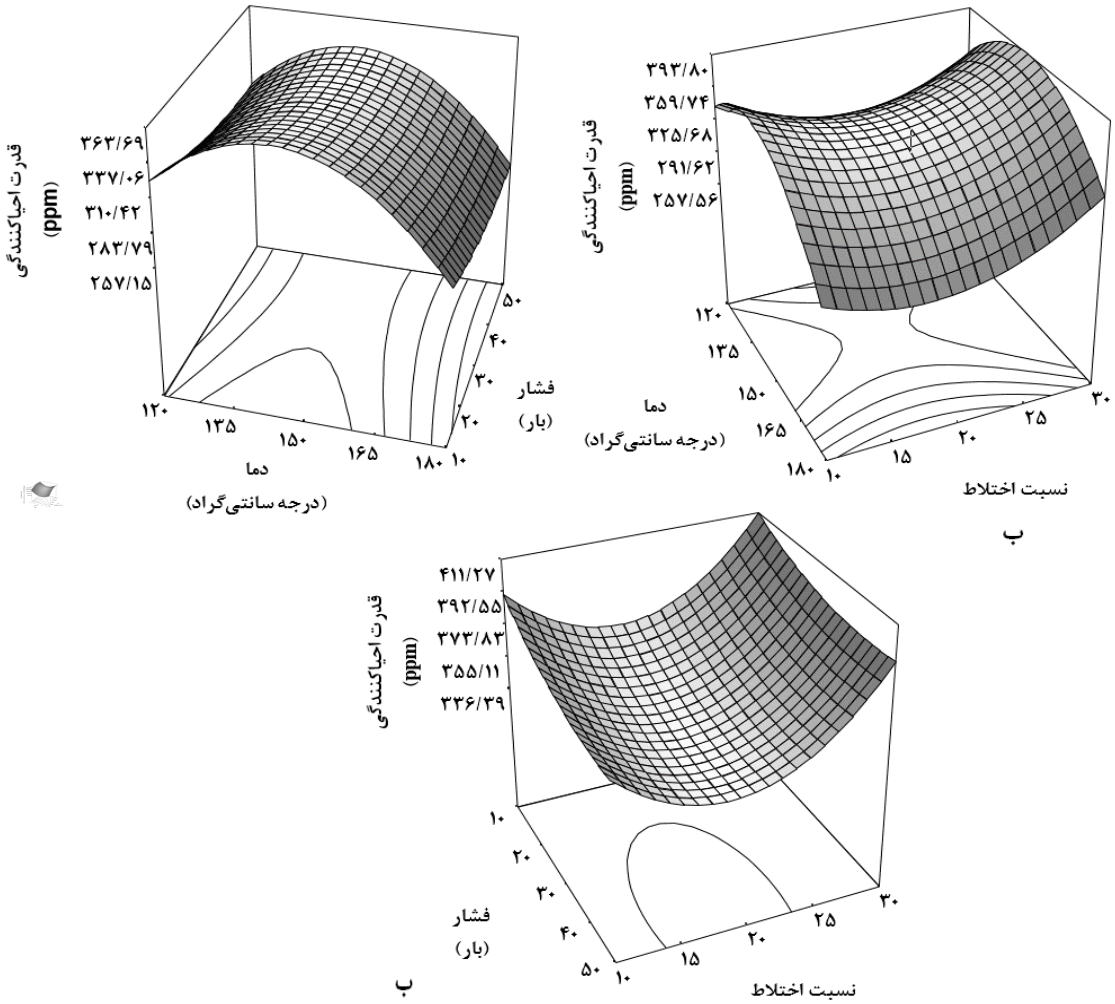
بررسی قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی

در مدل برازش داده شده برای قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته با استفاده از آب مادون بحرانی، پارامترهای درجه دوم نسبت اختلاط نمونه و حلال و اثر متقابل دما و فشار، تاثیر معنی داری در پیش بینی داده‌های به‌دست آمده نداشتند و از طرفی بیشترین تاثیر به متغیر خطی دما و کمترین اثر به پارامتر اثر متقابل دما و نسبت اختلاط ارتباط داشت.

$$Y= 6.94+ 0.99b_1- 0.37b_2- 0.36b_3- 0.02b_{11}+ 0.17b_{22}- 0.18b_{13}+ 0.05b_{23} \quad (۵)$$

در این روش از شرایط تشدید شده اکسایش مانند دمای بالا و جریان هوا استفاده می‌شود. اکسایش نمونه‌ها در ظروف مخصوص و در محفظه مجهز به گرم کن انجام شد. در این حال جریانی از هوا از محل واکنش اکسایش به ظرف محتوی آب، هدایت و ضریب هدایت الکتریکی آب بر حسب میکروزیمنس بر سانتیمتر (µs/cm) محاسبه می‌گردد. افزایش هدایت الکتریکی آب به‌عنوان شاخصی از پیشرفت اکسایش در نظر گرفته می‌شود. نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، در تمامی فشارهای مورد مطالعه، قدرت پایدارکنندگی عصاره در روغن سویا افزایش یافت. با بررسی متغیر فشار، مشخص شد که در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد، با افزایش فشار، قدرت پایدار کنندگی کاهش داشت اما در دماهای بالا (۱۸۰ درجه سانتی‌گراد) افزایش فشار از ۱۰ تا ۵۰ بار، تغییر چندانی در قدرت پایدارکنندگی

عصاره‌ها ایجاد نکرد. به‌نظر می‌رسد در این حالت متغیر اصلی موثر در فرایند استخراج، تغییرات دما بوده است.



شکل ۲- اثر متقابل پارامترهای دما – فشار (الف)، دما– نسبت اختلاط (ب) و فشار– نسبت اختلاط (ج) بر قدرت احیاکنندگی آهن به‌وسیله عصاره های استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی.

Fig. 2. Interaction of temperature-pressure (a), temperature-mixing ratio (b) and pressure-mixing ratio (c) parameters on the reduction power of extracts from pistachio hull by subcritical water.

با بررسی اثر متقابل دما و نسبت اختلاط در مورد قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی، مشخص شد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، در تمامی نسبت اختلاط‌های مورد مطالعه، قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی افزایش یافت ولی با افزایش فشار از ۱۰ تا ۵۰ بار قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی کاهش یافت با این توضیح که شدت کاهش قدرت پایدارکنندگی روغن با افزایش فشار، در دماهای بالاتر، بیشتر بوده است.

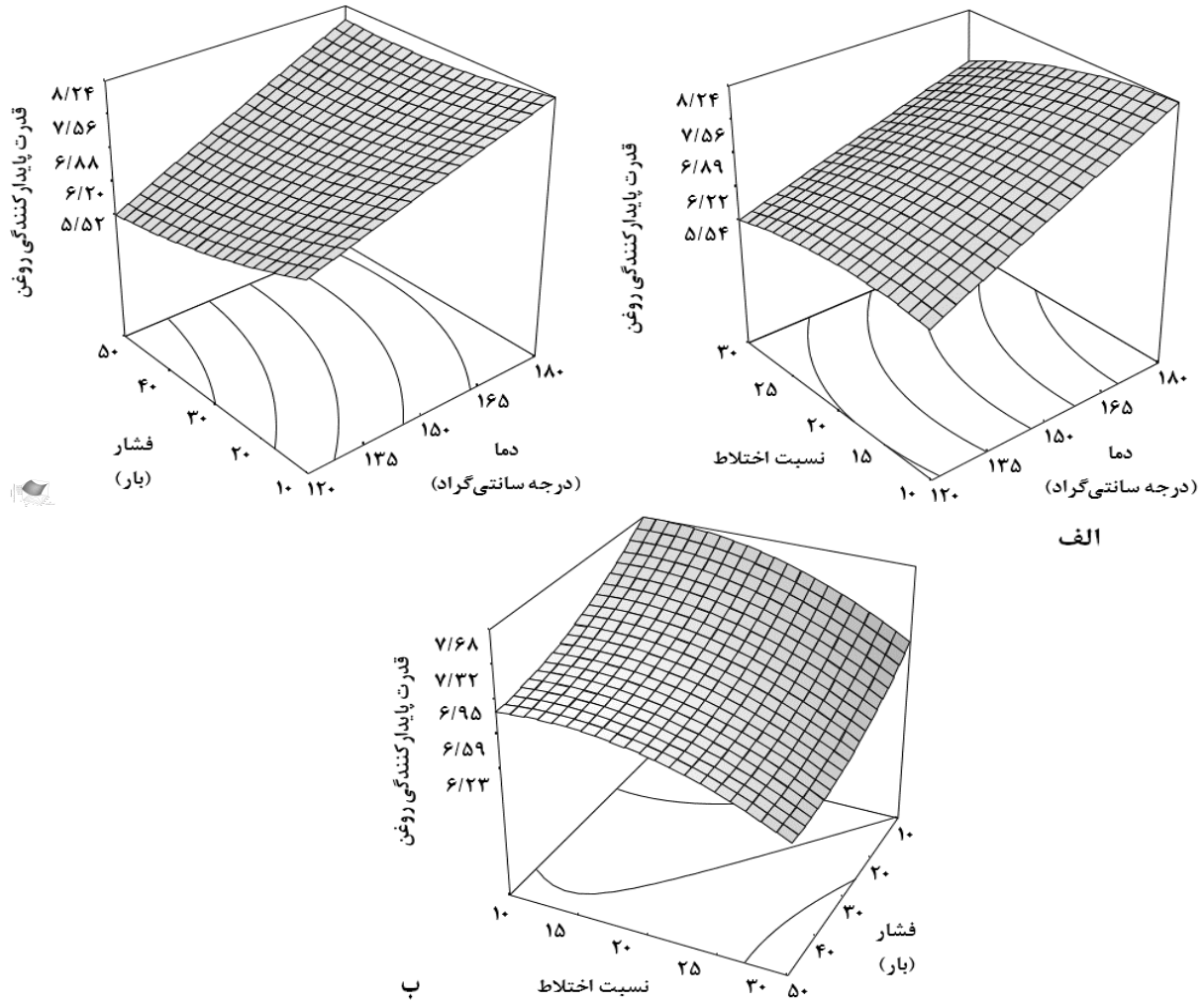
نتایج نشان داد که با افزایش نسبت اختلاط از ۱:۱۰ تا ۱:۳۰، در تمامی فشارهای مورد مطالعه، قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته کاهش یافت. این امر به دلیل افزایش استخراج ترکیبات غیرموثر در قدرت پایدارکنندگی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد با افزایش نسبت اختلاط نمونه و حلال در مواردی ترکیباتی استخراج شده اند که باعث کاهش قدرت پایدار کنندگی روغن سویا بودند.

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه که باعث پایداری روغن سویای فاقد آنتی‌اکسیدان تلقیح شده با عصاره‌های استخراج شده توسط آب مادون بحرانی از پوست پسته در رنج بین ۵/۰۸ تا ۸/۶۹ ساعت بود در مقایسه با نتایج Chandrika و همکاران (۲۰۰۷) روی اثر افزایش عصاره‌های استخراج شده از گندم نانوایی و گندم درم بر چند نوع روغن

خوراکی مطالعه نمودند، حاکی از اثر بسیار بیشتر عصاره‌های استخراجی از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی بود (Chandrika *et al.*, 2007).

Mrabet و همکاران (۲۰۱۷) قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از چند واریته خرما را مورد مطالعه قرار دادند، بیان نمودند که افزودن ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره به روغن سویا، باعث افزایش پایداری آن به میزان ۱/۷۱ ساعت شده بود (Mrabet *et al.*, 2017). Yang و همکاران (۲۰۱۶) بیان نمودند که با افزودن عصاره رزماری به مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به روغن‌های سویا، بذرکتان و روغن برنج، باعث پایداری این روغن‌ها تا به‌ترتیب ۳/۴، ۳/۳۵ و ۶/۲۲ ساعت می گردد که در مقایسه با مقادیر به‌دست آمده در این مطالعه که با افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست پسته به روغن سویا، حاصل شد بیانگر اثر بیشتر ترکیبات به‌دست آمده از پوست پسته به‌وسیله سیال مادون بحرانی آب می‌باشد (Yang *et al.*, 2016).

در مقایسه با نتایج عصاره بهینه شده و قدرت پایدارکنندگی BHT و ویتامین E، مشخص شد که قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی مشابهت بیشتری به قدرت پایدارکنندگی آلفاتوکوفرول، نسبت به BHT دارد (جدول ۵).



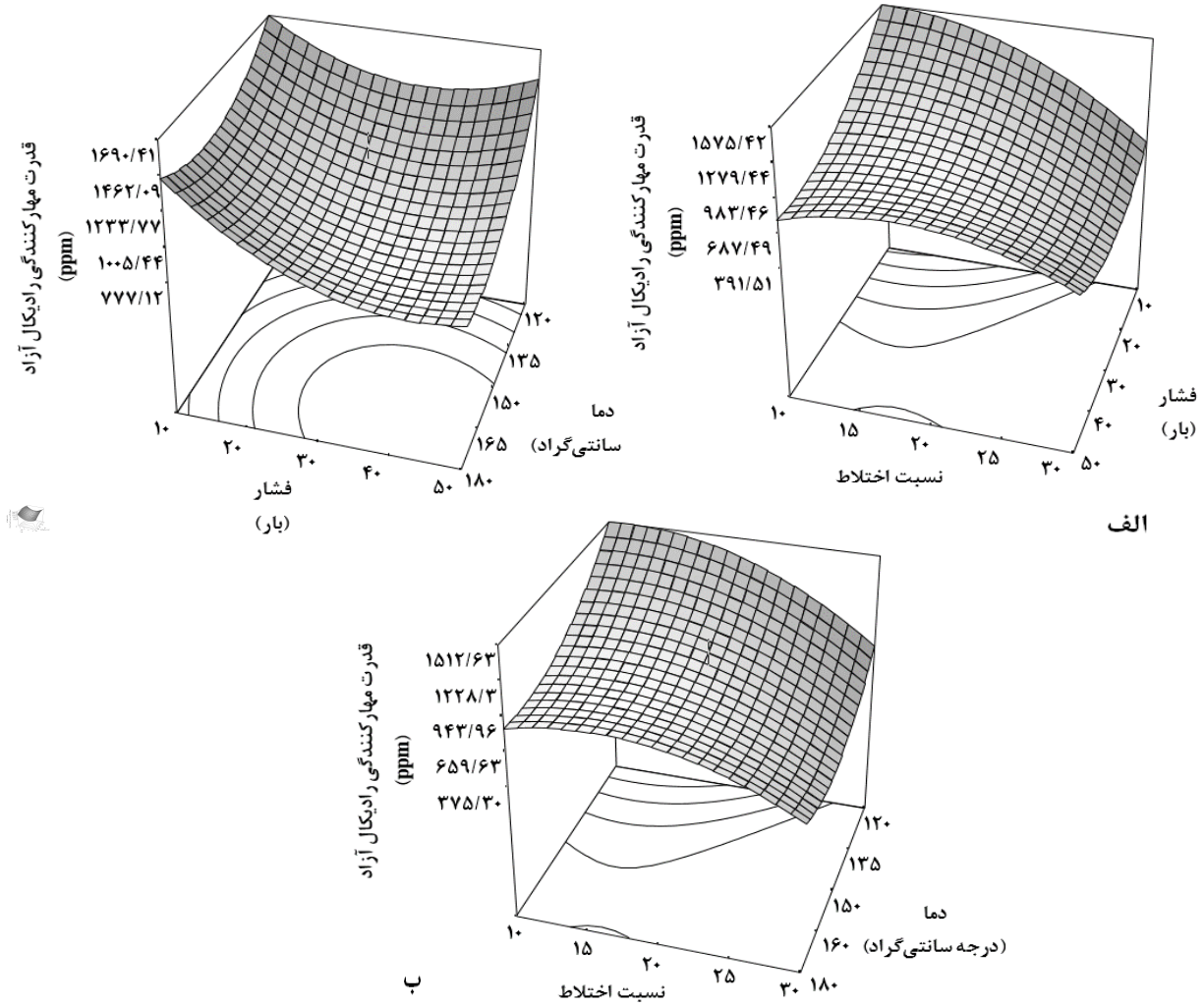
شکل ۳- اثر متقابل پارامترهای دما– فشار (الف)، دما– نسبت اختلاط (ب) و فشار– نسبت اختلاط (ج) بر قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی در محیط روغن سویا.

Fig. 3. Interaction of temperature-pressure (a), temperature-mixing ratio (b) and pressure-mixing ratio (c) on the stability power of pistachio hull extracts by subcritical water in soybean oil.

بررسی قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراجی

تمامی پارامترهای خطی، درجه دوم و اثرمتقابل در مدل برازش شده برای قدرت جذب رادیکال‌های آزاد توسط عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته، دارای اثر معنی داری بودند ($P<0.05$). در این میان بیشترین اثر به پارامتر خطی نسبت اختلاط نمونه و حلال و کمترین اثر نیز به پارامتر اثر متقابل دما و نسبت اختلاط ارتباط داشت.

$$y= 2601.27- 224.10b_1- 201.00b_2- 280.81b_3+ 227.74b_{11}+ 241.23b_{22}- 228.94b_{33}- 104.93b_{12}+ 101.73b_{13}+ 180.04b_{23} \quad (۶)$$



شکل ٤- اثر متقابل پارامترهای دما– فشار (الف)، فشار– نسبت اختلاط (ب) و دما– نسبت اختلاط (ج) بر مقدار قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH توسط ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی.

Fig. 4. Interaction of temperature-pressure (a), pressure-mixing ratio (b) and temperature-mixing ratio (c) on the amount of DPPH free radical scavenging ability by phenolic compounds extracted from pistachio hull by subcritical water.

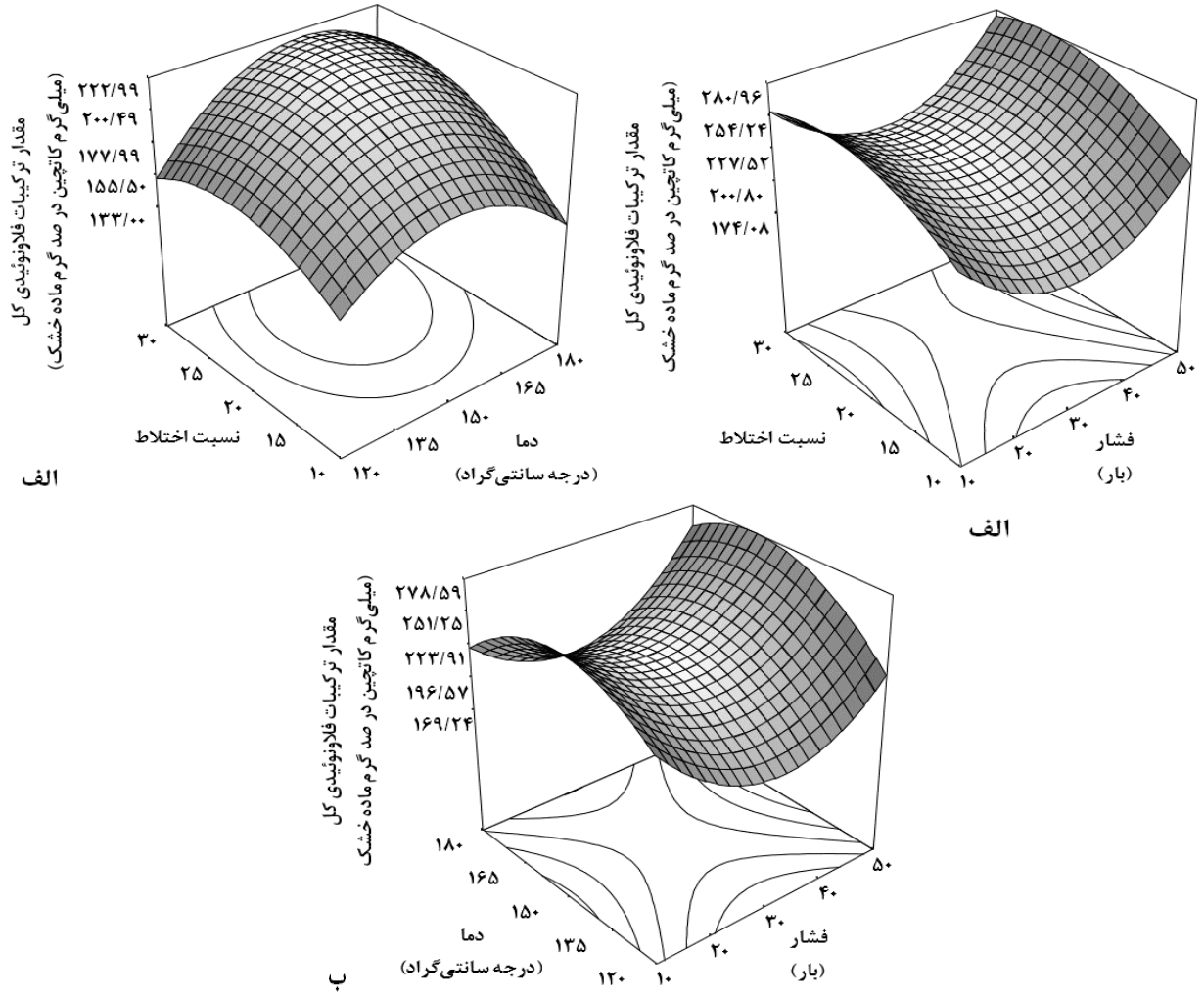
رادیکال DPPH یک ترکیب معمول در ارزیابی قدرت جذب رادیکال‌های آزاد به‌وسیله پلی‌ساکاریدها می‌باشد (Tian *et al*., 2012). در آزمون جذب و غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد DPPH، آنتی اکسیدان‌ها رنگ بنفش تیره پایدار رادیکال DPPH را به زرد کمرنگ دی‌فنیل پیکریل هیدرازین تبدیل می‌کنند. تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر جذب رادیکال‌های آزاد DPPH، به ظرفیت اشتراک گذاری هیدروژن توسط آن‌ها مربوط می‌شود (Chen *et al*., 2008).

قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH به‌وسیله عصاره‌های استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با استفاده از پارامتر IC_{50} مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش دمای استخراج از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراج شده کاهش یافته است. این روند در تمامی فشارهای مورد مطالعه مشاهده شد با این تفاوت که شدت کاهش قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌ها در فشارهای بالا بیشتر بوده است.

این امر به خاطر از بین رفتن ترکیبات با قدرت رادیکال گیرندگی بالا و در عوض ایجاد ترکیبات غیر موثر در قدرت رادیکال گیرندگی بوده است. با توجه به شکل ۴ ب می‌توان گفت که با افزایش نسبت اختلاط قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراج شده کاهش یافت. این روند در تمامی دماهای مورد مطالعه مشاهده شد. آنچه که مشخص است اینکه ظرفیت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH منحصرا به یک گروه منفرد از ترکیبات آنتی اکسیدانی ارتباط ندارد، بلکه در حقیقت خاصیت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراجی به مجموعه‌ای از ترکیبات استخراج شده مربوط می‌باشد که منجر به بروز خاصیت جذب رادیکال‌های آزاد می‌گردد (Thoo *et al.*, 2010). با توجه به جدول ۵ می‌توان بیان نمود که در مجموع قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته، در مقایسه با سایر خواص آنتی‌اکسیدانی (قدرت پایدارکنندگی و قدرت احیاکنندگی) از قدرت کمتری برخوردار بوده‌اند. با بررسی اثر متقابل فشار و نسبت اختلاط نمونه و حلال مشخص شد که بیشترین قدرت رادیکال گیرندگی در فشار ۱۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۱۰ مشاهده شد و کمترین قدرت رادیکال گیرندگی در فشار ۵۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۳۰ گزارش شد.

بررسی مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل

در مورد تاثیر پارامترهای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پوست پسته که توسط آب مادون بحرانی انجام شد، جدول ۲ نشان داد که پارامترهای خطی فشار، درجه دوم فشار و همچنین پارامترهای اثرمتقابل فشار با دما و نسبت اختلاط، تاثیر معنی‌داری در معادله برازش داده شده برای ترکیبات فلاونوئیدی کل نداشته و از معادله حذف شدند.



شکل ۵- اثر متقابل پارامترهای دما- نسبت اختلاط (الف)، فشار- نسبت اختلاط (ب) و فشار- دما (ج) بر مقدار فلاونوئیدی کل استخراج شده از پوست پسته به‌وسیله آب مادون بحرانی.

Fig. 5. Interaction of temperature-mixing ratio (a), pressure-mixing ratio (b) and pressure-temperature (c) on the total flavonoid content extracted from pistachio hull by subcritical water.

از اینرو معادله نهایی مطابق با فرمول زیر تعریف گردید:

$$Y= 223.73+ 9.58b_1+ 20.05b_3- 40.45b_{11}- 25.45b_{33} \quad (۷)$$

در میان پارامترهای معنی‌دار، پارامتر درجه دوم دما بیشترین تاثیر را در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی دارا بود و کمترین اثر به پارامتر خطی دما مربوط بود (جدول ۲).

بررسی تغییرات مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های استخراجی از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی حاکی از آن بود که مقدار این ترکیبات و میزان تغییرات ترکیبات فنولی، با یکدیگر همپوشانی داشته و از یک الگوی کلی طبعیت می‌نمودند. این تغییرات در مورد تیمار دما و فشار از نمود بیشتری برخوردار بود بدین‌صورت که تغییر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی با تغییرات بیشتری همراه بود. به‌طورکلی مقدار ترکیبات فلاونوئیدی با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، افزایش و پس از آن به دلیل تاثیر مخرب دما بر ساختار ترکیبات فلاونوئیدی، مقدار این ترکیبات کاهش پیدا کرد (شکل ۵، الف و ج). Shi و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی استخراج ترکیبات پلی فنولی از دانه انگور مطالعه نمودند و بیان داشتند که افزایش دما در روش استخراج مادون بحرانی آب در دماهای بالاتر از ۱۶۰-۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، باعث تخریب و یا درهم‌گسیختگی دمایی این ترکیبات می‌شود (Shi et al., 2003).

بهترین نسبت اختلاط نمونه و حلال در روش مادون بحرانی برای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی، نسبت اختلاط ۱:۲۰ بود و با کاهش نسبت اختلاط و استفاده از مقدار کمتری حلال در برابر نمونه، استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از نمونه به صورت کامل انجام نشد و در نسبت اختلاط‌های بالا (۱:۳۰)، به دلیل وجود و حضور مقدار حلال بیشتر نسبت به نمونه، علاوه بر ترکیبات فلاونوئیدی، سایر ترکیبات ناخواسته نیز استخراج و وارد حلال شدند (شکل ۵، الف و ب). مطبق با شکل ۵، علیرغم اینکه در فشارهای بالاتر و کمتر از ۳۰ بار، مقدار استخراج ترکیبات فلاونوئیدی افزایش یافت اما با توجه به نتایج ارائه شده در جدول آنالیز واریانس (جدول ۱)، این پارامتر تاثیر معنی‌داری در تغییر ترکیبات فلاونوئیدی نداشت. محققان در سال ۲۰۲۰ که بر روی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پوست مرکبات (*Citrus unshiu*) توسط آب مادون بحرانی مطالعه نمودند اظهار داشتند که در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، تجزیه دمایی این ترکیبات رخ داده است (Kim and Ko, 2020). و همکاران در سال ۲۰۱۶ با مطالعه بر روی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پوست میوه *Satsuma mandarin*، به این نتیجه رسیدند که دمای بهینه برای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی، دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Ko et al., 2016).

جدول ٤- بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره از پوست پسته توسط سیال مادون بحرانی آب

Table 4- Optimization of pistachio hull extraction conditions by subcritical water

دما (°C)	فشار (bar)	نسبت اختلاط نمونه و حلال	ترکیبات فنولی TPC (mg G.A/100 g d.m)	قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm)	قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)	ترکیبات فلاونوئیدی کل Total Flavonoid (mg Cat/100g d.m)	درجه مطلوبیت (%)
147	10	19	2497.8	362.94	7.44	1370.77	267.99	0.70

جدول ٥- مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره بهینه استخراج شده و خواص آنتی اکسیدانی BHT، اسید آسکوربیک و آلفاتوکفرول

Table 5- Comparison of antioxidant properties of optimized extract with antioxidant properties of BHT, ascorbic acid and alpha-tocopherol

	قدرت احیاکنندگی Reducing power (ppm))	قدرت پایدارکنندگی Stability power (h)	قدرت رادیکال گیرندگی Radical scavenging ability (ppm)
عصاره بهینه استخراج توسط سیال مادون بحرانی آب	304.51	7.45	1632.29
BHT	177.89	7.81	484.55
اسید آسکوربیک	24.84	-	187.88
آلفا توکفرول	-	5.33	-

بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات فنولی از پوست پسته

بهینه‌سازی فرایند عصاره‌گیری از پوست پسته توسط آب مادون بحرانی، به‌منظور رسیدن به حداکثر ترکیبات فنولی، حداکثر قدرت احیاکنندگی یون‌های آهن، بیشترین قدرت پایدارکنندگی روغن سویا، بالاترین میزان قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH و حداکثر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی، با در نظر گرفتن استفاده از دماهای پایین‌تر و کاربرد فشارهای پایین‌تر (به‌منظور صرفه جویی در انرژی) و همچنین استفاده از نسبت اختلاط‌های کمتر (به‌منظور به کار بردن مواد اولیه کمتر) انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از دمای ۱۴۳ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۱۹، منجر به رسیدن اهداف تعیین شده گردید (جدول ۴).

نتیجه‌گیری

عصاره‌های استخراج شده از پوست پسته توسط سیال مادون بحرانی آب، دارای محتوای نسبتا بالایی از ترکیبات فنولی بودند و در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT، از قدرت احیاکنندگی خوبی برخوردار بودند. همچنین عصاره‌های به‌دست آمده از پوست پسته از لحاظ قدرت رادیکال گیرندگی نیز نزدیکی بیشتری با BHT، نسبت به اسید آسکوربیک داشتند. در رابطه با قدرت پایدارکنندگی روغن سویا نیز می‌توان بیان نمود که BHT نسبت به آلفاتوکفرول، قابلیت بیشتری در پایدارکردن روغن سویا دارد و قدرت آن مشابهت بیشتری با عصاره‌های به‌دست آمده از پوست پسته دارد.

منابع

1. Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Niazmand, R. and Najaf Najafi, M. (2016). Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36: 234–244. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.005
2. Akhtar, M. J., Ahamed, M. and Alhadlaq, H. A. (2017). Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in ROS associated degenerative disorders. *BBA - General Subjects*, 1861: 802-813. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.01.018
3. Al-Dabbas, M. M., Suganuma, T., Kitahara, K., Xing Hou, D. and Fujii, M. (2006). Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of Varthemiaiphionoides Boiss. *Extracts Journal of Ethnopharmacology*, 108:287-293. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.006
4. Ayala, R. S. and Luke de castro, M. D. (2001). Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*, 75:109–113. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00212-6
5. Braud, L., Battault, S., Meyer, G., Nascimento, A., Gaillard, S., de Sousa, G., Rahmani, R., Riva, C., Armand, M., Maixent, J. M. and Reboul, C. (2017). Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 40: 95-104. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.10.012
6. Chandrika, M., Pathirana, L. andShahidi, F. (2007). The antioxidant potential of milling fractions from breadwheat and durum. *Journal of Cereal Science*, 45: 238–247. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.08.007
7. Chen, Y., Xie, M. Y., Nie, S. P., Li, C., and Wang, Y. X. (2008). Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of Ganodermaatrum. *Food Chemistry*, 107 (1): 231–241. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.021
8. Ertiken, C. and Yaldiz, O. (2004). Drying of eggplant and selection of a suitable thin layer drying model. *Journal of Food Engineering*, 63:349–359. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.08.007
9. Fregaa, N., Mozzona, M. and Lerckerb, G. (1999). Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *JAOCS*, 76, 325–329. https://doi.org/10.1007/s11746-999-0239-4
10. He, L., Zhang, X., Xu, H., Xu, C., Yuan, F., Knez, Z., Novak, Z. and Gao, Y. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punicagranatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–$ABTS^{\bullet+}$ assay. *Food and Bioproducts Processing*, 243: 1-9. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.03.003
11. Horchani, H., Ben Salem, N., Zarai, Z., Sayari, A., Gargouri, Y. and Chaâbouni, M. (2010). Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized Staphylococcus aureus lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. *Bioresource Technology*, 101: 2809–2817. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.082
12. Jayaprakasha, G., Singh, R., and Sakariah, K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitisvinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73 (3): 285–290. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00298-3
13. Kerr, J., andLide, D. (2000). CRC handbook of chemistry and physics 1999–2000 (81st ed.). *Boca Raton, FL, USA:* CRC Press.

14. Kim, D. S., Lim, S. B. (2020). Kinetic study of subcritical water extraction of flavonoids from citrus unshiu peel. Separation and Purification Technology, 1-9 .
15. Ko, M.J., Kwon, H.L., Chung, M.S. (2016). Pilot-scale subcritical water extraction of flavonoids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu Markovich*) peel. Innovative Food Science and Emerging Technologies, DOI:10.1016/j.ifset.2016.10.00
16. Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. (2004). Use of different method for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85:633-640. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024
17. Kumar, M. Y., Dutta, R., Prasad, D., and Misra, K. (2011). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (*Hippophaerhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 127(3): 1309–1316. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.088
18. Maghsoudlou, E., Esmaeilzade Kenari, R. and Raftani Amiri, Z. (2016). The effects of extraction technique on phenolic compounds extracted from fig (*Ficuscarica*) pulp and skin. *Iranian Food Science and Technology* Research Journal, 11 (6): 758-769.
19. Mohammadi, M., Ghorbani, M., Beigbabaei, A., Yeganehzad, S., Sadeghi-Mahoonak, A. 2019. Investigation effects of extracted compounds from shell and cluster of pistachio nut on the inactivation of free radicals, Heliyon, 5: e02438. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02438
20. Mrabet, A., García-Borrego, A., Jiménez-Araujo, A., Fernández-Bolaños, J., Sindic, M. and Rodríguez-Gutiérrez, M. 2017. Phenolic extracts obtained from thermally treated secondary varieties of dates: Antimicrobial and antioxidant properties. LWT- *Food Science and Technology*, 79: 416-422. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.064
21. Pintoa, D., Vieira, E. F., Peixoto, A. F., Freire, C., Freitas, V., Costa, P., Delerue-Matos, C., Rodrigues, F. (2021). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chemistry*, *334*, 127521. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127521
22. Rajaei, A., Barzegar, M., MohabatiMobarez, A., Sahari, M. A. and Hamidi Esfahani, Z. (2010). Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachiavera*) green hull extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 107–112. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.023
23. Ramos, L., Kristenson, E. and Brinkman, U. T. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(1): 3–29. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01336-5
24. Rodrigues, L.G.G., Mazzutti, S., Siddique, I., da Silva, M., Vitali, L., Ferreira, S.R.S. (2020). Subcritical Water Extraction and Microwave-Assisted Extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* Mill.), *The Journal of Supercritical Fluids*, https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104976
25. Shaddel, R., Maskooki, A., Haddad-Khodaparast, M. H., Azadmard-Damirchi, S., Mohamadi, M. and Fathi-Achachlouei, B. (2014). Optimization of Extraction Process of Bioactive Compounds from Bene Hull Using Subcritical Water. *Food Sci. Biotechnol*, 23(5): 1459-1468. https://doi.org/10.1007/s10068-014-0200-7
26. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., and Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food Agriculture & Environment*, 1(2): 42–47. https://doi.org/10.1007/s10068-014-0200-7
27. Talebi, S., Alizadeh, M., Ramezanpour, S. and Ghasemnajad, A. (2020). The antioxidant properties of some endemic barberry genotypes of Iran. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 51 (1): 91-107.
28. Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C.W. and Tan, C. P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morindacitrifolia*). *Food Chemistry*, 120 (1): 290–295. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.064
29. Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C. and Martin Lo, Y. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricusbisporus*). *Carbohydrate Polymers*, 88: 522– 529. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.042
30. Tilahun, A. and Chun, B. S. (2017). Molecular modification of native coffee polysaccharide using subcritical water treatment: Structural characterization, antioxidant, and DNA protecting activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99: 555-562. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.034
31. USDA,http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome.
32. Yang, Y., Song, X., Sui, X., Qi, B., Wang, Z., Li, Y. and Jiang, L. (2016). Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. *Industrial Crops and Products*, 80: 141–147. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.044

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 295- 305

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۰۵-۲۹۵

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

The effect of oil to water ratio and emulsifier amount on the properties of chia seed oil nanoemulsion

Sara Forouzandeh[1], Mohammad Fazel[2*]

Received: 2021.03.09
Accepted: 2021.04.23

How to cite this article:
Forouzandeh, S., Fazel, M. (2022). The effect of oil to water ratio and emulsifier amount on the properties of chia seed oil nanoemulsion. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 295-305.

Abstract

Introduction: Nowadays, various methods have been developed to transfer and improve the absorption of lipophilic compounds in food in the form of coating. Colloidal emulsion-based systems are widely used in commercial systems. Chia seed oil is an oil rich in unsaturated fatty acids, especially omega 3 and omega 6, which can be used as the oily phase of nanoemulsions. The aim of this study was to investigate the fatty acid composition of chia seed oil and the effect of oil to water ratio and emulsifier on the properties of nanoemulsions of this oil.

Materials and Methods: Clean chia seeds were purchased as a pack from Zistfa Company and all other chemicals were purchased from Marack, Pars Shimi and Dr. Majelli companies. By using the oil set machine, the seeds were treated by cold pressing method and oil extraction efficiency was calculated .Gas chromatography (GC) was used to identify and measure the fatty acid composition of chia seed oil. In this study, nanoemulsions were produced in three levels of oil to water (20%, 35% and 50%) and in three levels of oil emulsifier (5%, 10% and 15%).To produce nanoemulsions, the aforementioned ratios were first calculated and determined .Then, Weigh the tweens 20 and 80 with chia seed oil and water and mix the emulsifiers with the chia seed oil on the stirrer. Then a mixture of 20 and 80 tweens and oil was added dropwise to the weighed distilled water. The mixture was stirred gently by a magnet. After this step, the mixture is placed in the refrigerator to reduce its temperature. After this time, it was placed in an ice bucket and placed in an ultrasonic homogenizer for 9 minutes at a power of 300 watts to form nanoemulsions. Then, the properties of nanoemulsions including particle size and distribution, coating efficiency and antioxidant properties were evaluated. Vasco model DLS (Dynamic light scattering) was used for the particle size. The particle size of nanoemulsions was determined by this device using dynamic light diffraction method. DPPH method was used to measure the antioxidant activity of oils and nanoemulsions and the antioxidant activity was calculated by using the formula. To evaluate the efficiency of coating of nanoemulsions, the amount of surface oil and total oil was measured and the efficiency was calculated by using the formula. The release rate of nanoemulsions was evaluated for 7 weeks. The tests were performed in three replications. Experimental data were analyzed in a completely randomized design with factorial test and Duncan test was used to compare the mean data. Software (Excel, 2010) was used to draw the graphs

Results and Discussion: According to the results obtained in this study, it can be said that chia seed oil contains a high percentage of unsaturated fatty acids and has a very high level of antioxidant properties (88.43%), which has antioxidant properties in the structure of nanoemulsions. Oil is better preserved in water. Other results showed that with increasing oil content of nanoemulsions, particle size, antioxidant properties and release increased and the coating efficiency decreased. Also, by increasing the ratio of emulsifier to oil in nanoemulsions, the coating efficiency and antioxidant properties increase and the particle size and release decreases. In the results obtained from these tests, the minimum particle size was 14.08 nm and the highest coating efficiency was 96.40%. The antioxidant activity of the samples was evaluated in the range of 5.61% to 21.43%. Also, the average release of samples at the end of 7 weeks of the

1 and 2. MSC Student and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Isfahan branch (Khorasgan), Isfahan, Iran.
(*Corresponding Author Email: mfazeln@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68787.1019

study reached nearly 18%. During storage, the treatments were quite stable for five months, which could be due to the low particle size and low release of samples. Considering the mentioned advantages, using nanoemulsions of this oil is a suitable option for enriching beverages.

Keywords: Nanoemulsion, Chia seed oil, Emulsifier, Antioxidant activity.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 295- 305

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۰۵-۲۹۵

مقاله علمی-پژوهشی

تاثیر نسبت روغن و مقدار امولسیفایر بر خصوصیات نانوامولسیون روغن دانه چیا

سارا فروزنده[۱]- محمد فاضل[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۳

چکیده

در این پژوهش راندمان استخراج، ترکیب و میزان اسیدهای چرب موجود در روغن دانه چیا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین نانوامولسیون‌های این روغن در سه سطح روغن به آب(۲۰٪، ۳۵٪ و ۵۰٪) و در سه سطح امولسیفایر به روغن(۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪) تولید شد. خصوصیات تمامی ۹ تیمار تولید شده شامل اندازه و توزیع ذرات،راندمان درون پوشانی و میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان رهایش نانوامولسیون‌ها به مدت ۷ هفته بررسی شد. در این مطالعه روغن دانه چیا با روش پرس سرد استخراج گردید و راندمان استخراج آن ۰۵/ ۲۷٪ اندازه گیری شد. برای ارزیابی ترکیب اسیدهای چرب این روغن از دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده گردید. این روغن دارای ۴۷/۰۹٪ لینولنیک اسید بود و میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن به‌طور میانگین (۸۸/۴۳٪) اندازه‌گیری شد. نتایج آزمون‌های انجام شده بر روی نانوامولسیون‌ها نشان داد که که با افزایش میزان روغن نانوامولسیون‌ها، اندازه ذرات و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و رهایش افزایش یافته و راندمان درون پوشانی کاهش می‌یابد. همچنین با افزایش نسبت امولسیفایر به روغن در نانوامولسیون‌ها راندمان درون پوشانی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته و اندازه ذرات و رهایش کم می‌شود. در نتایج به‌دست آمده از این آزمون‌ها کمترین اندازه ذرات ۱۴/۰۸ نانومتر بود و بیشترین راندمان درون پوشانی ۹۶/۴۰٪ به‌دست آمد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در محدوده ۵/۶۱٪ تا ۲۱/۴۳٪ ارزیابی شد. همچنین میانگین رهایش نمونه‌ها در پایان ۷ هفته بررسی به نزدیک ۱۸ درصد رسید. در طی نگهداری تیمارها به مدت پنج ماه، کاملا پایدار بودند.

واژه‌های کلیدی: نانوامولسیون، روغن دانه چیا، امولسیفایر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

چیا با نام علمی *Salvia hispanica*. L گیاهی علفی و یک ساله از جنس مریم گلی و از خانواده نعناییان[۳] است که یک گیاه سبز گلدار و بومی آمریکای لاتین می‌باشد.گل‌ها دارای رنگ‌های بنفش، آبی یا سفید هستند و دانه‌ها به شکل بیضی شکل با رنگ‌های قهوه‌ای تیره تا سفید مایل به خاکستری می‌باشند. این گیاه با اسامی متداول چیا، چیای مکزیکی و مریم گلی اسپانیایی شناخته می‌شود (Anacleto et al., 2016; Akinfenwa et al., 2020). دانه چیا حاوی ۵ درصد رطوبت، بین ۱۵ تا ۲۳ درصد پروتئین، ۲۵ تا ۴۰ درصد روغن، ۳۴ درصد فیبر غذایی، ۴۲ درصد کربوهیدرات کل، محتوای زیاد کلسیم (۳۳۵ –۸۶۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم)، فسفر، پتاسیم و منیزیم و مقدار کمتری از سدیم، آهن و روی (۴– ۱۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) می‌باشد. علاوه بر این، دانه چیا منبع خوبی از نیاسین، ویتامین A و C می‌باشد (Hadian et al., 2019). امروزه از دانه، آرد، موسیلاژ و روغن چیا به‌طور گسترده در صنایع غذایی استفاده می‌شود (Iglesias-Puig et al, 2013). برخی از مهم‌ترین کاربردهای این دانه، استفاده از آن به‌عنوان مکمل تغذیه‌ای و نیز به‌عنوان یک جزء مهم در فراورده‌های غلات، بیسکوئیت، پاستا، نان، اسنک و ماست و موارد دیگر می‌باشد (Hernandez, 2012). با توجه به این که این گیاه در مناطق خشک رشد می‌کند، به‌عنوان یک محصول جایگزین در صنعت زراعی به شدت توصیه می‌شود. دانه‌های چیا به‌عنوان منبعی از مواد مغذی و مواد افزودنی بیولوژیکی پتانسیل بسیار زیادی دارد و یکی از دانه‌های مورد علاقه علم، تکنولوژی و صنایع غذایی است (Chahardoli and Ahmadi chenarbon, 2017). روغن دانه چیا از طریق روش‌های استخراج از دانه به‌دست می‌آید که منجر به تغییر پارامترهای کیفی روغن می‌شود: خلوص، عملکرد، محتوای اسیدهای چرب، حفظ محتوای آنتی‌اکسیدان و عملکرد روغن. در طول سال‌ها از روش‌های مختلفی برای استخراج روغن از دانه‌ها استفاده شده است، مانند پرس سرد، استخراج با حلال معمولی، استخراج مایعات فوق بحرانی، استخراج به کمک امواج فراصوت و غیره. هر کدام از این روش‌ها

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68787.1019
۳ Lamiaceae

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: mfazeln@yahoo.com)

روغن با پارامترهای مختلف کیفیت تولید می‌کند: از نظر درصد خلوص و عملکرد، محتوای اسیدهای چرب، حفظ محتوای آنتی‌اکسیدان و سالم بودن روغن این میزان متفاوت می‌باشد. از این رو انتخاب روش به عواملی مانند اولویت‌های کمی و کیفی، ملاحظات زیست محیطی و هزینه فرآیند بستگی دارد (Akinfenwa et al., 2020). در صنعت نوشیدنی از میکرو و نانو امولسیون‌ها به‌عنوان سیستم‌های انتقال رنگ، عطر و طعم، آنتی‌اکسیدان‌ها و سایر ویتامین‌های محلول در چربی و مواد فعال زیستی در نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود. خاصیت منحصر به فرد میکرو و نانو امولسیون‌ها وضوح نوری است، که باعث می‌شود آنها در نوشیدنی‌های شفاف به‌عنوان سیستم‌های تحویل کاربرد بیشتری داشته باشند. از نانوامولسیون برای تولید نوشیدنی‌های ابری[1] نیز استفاده می‌شود. نانوامولسیون‌ها می‌توانند ترکیبات طعم‌دهنده را از شرایط تولید و در تمام مدت ماندگاری نوشیدنی حفظ کنند. تصور می‌شود که نانوامولسیون‌ها می‌توانند عطر و طعم را از دما، اکسیداسیون، واکنش‌های آنزیمی و هیدرولیزحفظ کنند و از نظر ترمودینامیکی در طیف گسترده ای از مقادیر pH ثابت هستند (Nutralease, 2011). از این رو در این پژوهش بر آن هستیم که علاوه بر بررسی روغن دانه چیا، به تولید نانوامولسیون‌های این روغن و بررسی تاثیر نسبت امولسیفایر به روغن و نسبت روغن به آب در نانوامولسیون‌های تولیدی در آزمون‌های اندازه و توزیع ذرات، راندمان درون پوشانی، رهایش و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بپردازیم.

مواد و روش‌ها

دانه‌های تمیز چیا با واریته White-blackبه‌صورت بسته‌بندی از شرکت زیستفا خریداری گردید و با استفاده از دستگاه oil set دانه‌ها به روش پرس سرد روغن‌گیری شدند. سپس با استفاده از دستگاه سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه و دور ۶ هزار در دمای ۴ درجه ناخالصی روغن جدا گردید.

راندمان استخراج روغن

برای مشخص کردن راندمان استخراج روغن، ابتدا وزن دانه مصرف شده و وزن روغن حاصل از آن تعیین شد و با استفاده از رابطه زیر میزان آن به‌دست آمد و از تقسیم آن بر میزان روغن اولیه دانه کارایی فرایند استخراج محاسبه گردید (Abdollahi et al., 2018).

$$R = \frac{Q}{X} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

در این رابطه R راندمان استخراج روغن به درصد، Q وزن روغن حاصله به گرم، X وزن دانه‌های اولیه به گرم می‌باشد.

بررسی ترکیب اسیدهای چرب روغن دانه چیا

برای بررسی ترکیب اسیدهای چرب از استاندارد ملی ایران شماره ۴۰۹۱ استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا ۱۵ قطره روغن دانه چیا، ۷ میلی‌لیتر ان‌هگزان و ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم متانولی اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در این مدت تشکیل دو فاز داد که فاز رویی حاوی اسیدهای چرب بود. برای تعیین نوع اسیدهای چرب و میزان آنها یک میکرولیتر از فاز بالا به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 6890 مجهز به ستون مویین (BPX 70) با مشخصات طول ۱۲۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و قطر خارجی ۰/۲۵ میلی‌متر و آشکارگر FID و گاز حامل نیتروژن با فشار ۴۲/۱۲ psi استفاده گردید. خروجی دستگاه کروماتوگرافی به‌صورت یک کروماتوگرام رسم می‌شود که در آن هر پیک نمایانگر یک اسید چرب است و سطح زیر هر پیک مقدار آن اسید چرب را نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آنالیز در قابل طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار توسط نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام گردید.

تولید نانوامولسیون روغن دانه چیا

برای تهیه نانوامولسیون از روش Saberi و همکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییر استفاده گردید (Saberi et al., 2013). برای نسبت امولسیفایر به روغن از سه نسبت ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد و برای نسبت روغن به آب از نسبت‌های ۲۰، ۳۵ و ۵۰ درصد روغن استفاده شد. امولسیفایرهای استفاده شده برای تولید نانوامولسیون‌ها توئین۲۰ و توئین۸۰ بودند. ابتدا نسبت‌های گفته شده محاسبه و تعیین گردید. سپس با استفاده از ترازو دو صفر، توئین ۲۰ و ۸۰ و روغن دانه چیا و آب را توزین کرده و سپس توئین ۲۰ و ۸۰ و روغن دانه چیا به مدت یک دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بر روی استیرر و به کمک مگنت مخلوط شدند. پس از آن آب مقطر توزین شده را به همراه مگنت بر روی استیرر که دمای آن ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود قرار داده و مخلوط توئین ۲۰ و ۸۰ و روغن را به صورت قطره قطره به آب مقطر اضافه گردید.این ترکیب توسط مگنت به آرامی هم‌زده شد. پس از انجام این مرحله ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال گذاشته شده تا دمای آن کاهش یابد. پس از گذشت این زمان آن را در یک بشر پر از یخ گذاشته و در دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک

---

[1] Cloudy beverages

به مدت ۹ دقیقه و توان ۳۰۰ وات قرار داده شد تا نانوامولسیون تشکیل شدند.

تعیین اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون‌ها

از دستگاه DLS (Dynamic light scattering) مدل واسکو استفاده گردید. تعیین اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها توسط این دستگاه به کمک روش پراش دینامیکی نور انجام شد که در واقع حرکت براونی ذرات را درون سامانه‌های کلوئیدی اندازه‌گیری می‌نماید. این دستگاه برای توزیع اندازه ذرات پارامتر PDI را ارائه می‌دهد (Marsanasco et al., 2011).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون روغن دانه چیا

به روش Singleton و همکاران (۱۹۶۵) با اندکی تغییر انجام شد (Singleton et al.,1965). بدین صورت که ۰/۰۰۱ گرم DPPH در ۵۰ سی‌سی اتیل استات حل گردید و ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه داشته شد. سپس ۰/۴ سی‌سی از روغن یا نانوامولسیون به ۴ سی‌سی DPPH اضافه شد و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه ماند. برای شاهد نیز ۰/۴ سی‌سی اتیل استات به ۴ سی‌سی DPPH اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی ماند. سپس جذب نمونه شاهد و نمونه روغن در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$I\% = \frac{Ac-As}{Ac} \times 100 \qquad (۲)$$

که در این رابطه I درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، Ac جذب شاهد و As جذب نمونه می‌باشد.

اندازه‌گیری راندمان درون پوشانی نانوامولسیون‌ها

اندازه‌گیری روغن سطحی

از روش Uluata و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی تغییر استفاده گردید. بدین صورت که ۱ گرم از نمونه نانوامولسیون با ۱۰ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه توسط همزن مغناطیسی هم‌زده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. سپس فاز آلی شفاف جدا شده و حلال آن در ۷۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید. پس از آن روغن باقیمانده وزن شد (Uluata et al., 2015).

اندازه‌گیری روغن کل

۰/۵ گرم از نمونه‌های امولسیون با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای محیط مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه توسط همزن مغناطیسی هم‌زده شد. ۲۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول الکل و n-هگزان به نسبت ۳:۱ به آن افزوده شده و به مدت ۱ دقیقه هم‌زده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و سپس فاز آلی شفاف جدا شده و حلال آن در ۷۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردیده و سپس روغن باقیمانده وزن شد (Uluata et al., 2015).

راندمان درون پوشانی

برای محاسبه راندمان درون پوشانی دو فاکتور روغن سطحی و روغن کل اندازه‌گیری می‌شود و راندمان بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$Ye(\%) = \frac{Ot-Of}{Ot} \times 100 \qquad (۳)$$

در این معادله Yeراندمان درون پوشانی (درصد)، O_t مقدار روغن کل (گرم) و O_f مقدار روغن آزاد می‌باشند.

مقدار روغن درون پوشانی شده در نانوامولسیون به‌وسیله محاسبه اختلاف بین مقدار کل روغن اولیه و مقدار روغن درون پوشانی شده باقی مانده در مایع شفاف اندازه‌گیری گردید (Tavakolipour and Mokhtarian, 2016).

اندازه‌گیری رهایش نانوامولسیون‌ها

برای اندازه‌گیری میزان رهایش روغن از نانوامولسیون‌ها، میزان روغن سطحی نانوامولسیون‌ها در یخچال و به مدت دو ماه اندازه‌گیری شد. در طی این مدت نانوامولسیون‌ها در یخچال و دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.از روش Uluata و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی تغییر استفاده شد (Uluata et al., 2015).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفتند. داده‌های آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با آزمون فاکتوریل بررسی و از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار (Excel, 2010) استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن دانه چیا

میزان روغن به واریته‌های گیاهی، موقعیت مکان، حاصل‌خیزی خاک، روش آسیاب کردن دانه، کهنه یا تازه بودن دانه‌ها، استخراج روغن و نوع حلال بستگی دارد (Timilsena et al, 2017). با استفاده از فرمول گفته شده در فصل قبل راندمان استخراج محاسبه گردید که به طور میانگین ۲۷/۰۵٪ اندازه گیری شد. Ixtaina و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی که انجام دادند، میزان روغن استخراج شده از دانه

چیا را به دو روش پرس و سوکسله بررسی کردند و مقدار آن را برحسب نوع روش استخراج بین ۳۳/۶ -۲۰/۳ درصد گزارش کردند (Ixtaina et al., 2011). راندمان استخراج روغن با حلال بیشتر از روش پرس بود. بنابراین همان‌طور که گفته شد با توجه به تفاوت‌ها، میزان راندمان استخراج روغن در محدوده می‌باشد.

مقادیر اسیدهای چرب روغن دانه چیا با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی به‌دست آمد. نتایج این تحقیق به همراه نتایج سایر پژوهشگران در جدول ۱ آمده است.

منشأ دانه چیا، شرایط جغرافیایی، نوع خاک و رنگ همه پارامترهای مهمی هستند که بر مشخصات اسیدهای چرب روغن دانه چیا تأثیر می‌گذارند (Kaya, 2019). در تحقیقی Ayerza و Coates (۲۰۱۱) دانه‌های چیا را در سه ناحیه با شرایط آب و هوایی(دما، ارتفاع، نوع آبیاری و میزان بارش سالانه) متفاوت را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که محل رشد بذر بر روی محتوای پروتئینی و روغنی آن تأثیر دارد. بدینصورت که با افزایش ارتفاع و کاهش دما محتوای پروتئینی و میزان اشباعیت روغن کاهش می‌یابد (Ayerza and Coates, 2011). در میان عوامل محیطی دما مهمترین عامل در کیفیت روغن محسوب می‌شود که تا حدود زیادی می‌تواند در تعیین نوع اسیدهای چرب روغن موثر باشد (Velasco & Fernandez-Martinez,2002). ترکیب اسیدهای چرب روغن چیا آزمایش شده با نتایج سایر محققان تا حدودی مشابه بوده و اثبات کننده این موضوع است که روغن دانه چیا حاوی درصد بالایی اسیدهای چرب چندغیراشباع می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود در روغن آزمایش شده کمی درصد استئاریک اسید بالاتر از سایر نتایج بوده که دلیل آن می‌تواند همان عوامل گفته شده باشد.

جدول ۱- مقایسه ترکیب اسیدهای چرب روغن دانه چیا

Table 1- Comparison of fatty acid composition of chia seed oil

Ixtaina et al., (2011)	Matinez et al., (2012)	Bushway et al., (1981)	Imani et al., (2020)	Results this research نتایج این تحقیق	chemical formula فرمول شیمیایی	Fatty acid اسید چرب
6.6	7.3	27.4	6.87	14.77	C 16:0	Palmitic acid پالمتیک اسید
3.1	2.8	12.3	2.29	4.84	C l8:0	Stearic acid استئاریک اسید
5.4	7.4	21.2	4.88	11.79	C 18:1	Oleic acid اولئیک اسید
20.3	22	12.8	18.80	15.14	C l8:2	Linoleic acid لینولئیک اسید
64.4	60.5	15.4	66.32	47.09	C l8:3	Linolenic acid لینولنیک اسید
0.1	-	10.9	0.84	6.37	--	Other fatty acids اسیدهای چرب
9.7	10.1	39.7	9.9	23.50		Total saturated fatty acids مجموع اسیدهای چرب اشباع
5.4	7.4	21.2	6.39	13.02		Total monounsaturated fatty acids مجموع اسیدهای چرب تک غیراشباع
84.8	82.5	28.2	82.97	63.48		Total polyunsaturated fatty acids مجموع اسیدهای چرب چند غیر اشباع

خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوامولسیون‌های روغن دانه چیا

اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون‌ها

کنترل و اندازه گیری اندازه ذرات بسیار مهم است، زیرا این ویژگی در مشخصات نانو امولسیون‌ها مانند ظاهر، پایداری، خصوصیات نوری، رئولوژی، مشخصات انتشار و دسترسی زیستی نقش مهمی دارد (Assadpour et al., 2016; Jafari et al., 2008). از مزایای پایین بودن اندازه ذرات می‌توان به سطح بالاتر و دسترسی زیستی بیشتر، پایداری کلوئیدی بیشتر، کدورت کمتر محلول‌ها به علت شکست نور کمتر اشاره کرد. بر روی تمام تیمارها اندازه و توزیع ذرات آزمایش و مورد بررسی قرار گرفت. اندازه ذرات نمونه‌ها از حدود ۱۴/۸ نانومتر تا ۱۲۳/۷ نانومتر بودند (جدول ۳). با افزایش SOR اندازه ذرات کاهش و با افزایش میزان روغن اندازه ذرات افزایش یافت. علت این موضوع را می‌توان به وجود سورفکتانت‌های کوچک مولکول توئین مرتبط دانست. سورفکتانت‌های کوچک مولکولی مانند توئین به دلیل توانایی بسیار بالاتر آنها در جذب سریع به سطح قطرات و کشش سطحی

دینامیکی بسیار پایین‌تر آنها نسبت به سورفکتانت‌های بزرگ مولکول و بیوپلیمرها بیشترین توانایی را برای شکل‌دهی امولسیون، با اندازه قطرات کوچک‌تر دارند (Wooster et al., 2008). افزایش غلظت سورفکتانت باعث نفوذ بیشتر مولکول‌های سورفکتانت از فاز آلی به فاز آبی و تثبیت سورفکتانت‌ها در حد فاصل بین دو فاز می‌شود. به این ترتیب قطرات ریزتر روغن در مرز دو فاز تشکیل می‌شوند (Rao and McClements., 2011). این در حالی است که افزایش بیش از حد مقدار سورفکتانت با تشکیل فاز کریستال مایع و افزایش ویسکوزیته، مانع اختلاط مناسب دو فاز می‌شود. به این ترتیب اندازه قطرات افزایش می‌یابد و توزیع قطرات به صورت دوگانه و چندگانه می‌شود. عدم مشاهده چنین پدیده‌ای در این تیمارها بیانگر استفاده از بازده مناسبی از SOR برای آنها می‌باشد. Venkadesaperuma و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادندکه با افزایش مقدار روغن در نانوامولسیون ویتامین ای-استات، میانگین قطر ذرات بیشتر گردید (Venkadesaperuma et al., 2016). Ribeiro و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که افزایش میزان روغن و مدت زمان فراصوت باعث افزایش میانگین اندازه ذرات گردید (Ribeiro et al., 2015). نتیجه به‌دست آمده از این تحقیق با نتایج سایر محققان مطابقت داشت.

جدول ۲- تیمارها و کدهای مربوط به آن‌ها

Table 2- Treatments and related codes

Code کد	SOR(%)	Oil(%) روغن (٪)	Treatment تیمار
O20S5	5	20	**1**
O20S10	10	20	**2**
O20S15	15	20	**3**
O35S5	5	35	**4**
O35S10	10	35	**5**
O35S15	15	35	**6**
O50S5	5	50	**7**
O50S10	10	50	**8**
O50S15	15	50	**9**

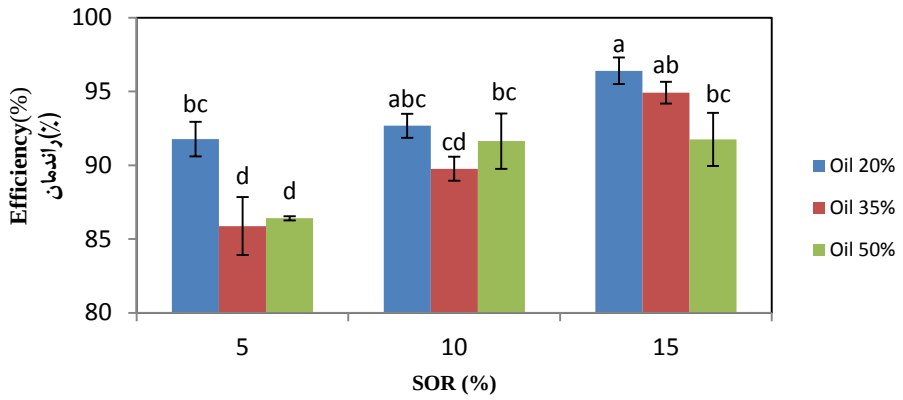
جدول ۳- اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها

Table 3- Particle size of nanoemulsions

	(O20S) تیمار ۱	(O20S10) تیمار ۲	(O20S15) تیمار ۳	(O35S5) تیمار ٤	(O35S10) تیمار ٥	(O35S15) تیمار ٦	(O50S5) تیمار ۷	(O50S10) تیمار ۸	(O50S15) تیمار ۹
Particle size (nm) اندازه ذرات (نانومتر)	74.39	37.18	21.35	98.17	14.08	17.74	123.7	25.68	19.46
Standarddeviation (%) انحراف معیار (٪)	9.12	7.95	6.25	5.82	6.6	9.03	4.99	6.14	9.35

راندمان درون پوشانی

در این تحقیق درصد راندمان درون پوشانی تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت.درصد راندمان درون پوشانی نمونه‌ها بالای ۸۵٪ بود (شکل ۱). در آزمایش انجام شده بر روی تیمارها، تاثیر درصد روغن و SOR در سطح ۹۹٪ معنی‌دار است. با افزایش درصد روغن راندمان کاهش یافته و با افزایش SOR راندمان افزایش یافته است. افزایش غلظت سورفکتانت در نانوامولسیون‌ها در اکثر موارد سبب افزایش میزان جذب سورفکتانت به سطح امولسیون گردیده و در نتیجه باعث کاهش بیشتر کشش سطحی شده و در نهایت باعث کاهش اندازه ذرات و افزایش راندمان درون پوشانی می‌گردد. به این دلیل که افزایش غلظت سورفاکتانت سطح ذرات را به خوبی پوشانده، از تجمع، هم‌آمیختگی و نشت اسیدهای چرب بـه فـاز پیوسـته جلوگیری می‌کند (Faraji et al., 2020). در پژوهشی Frascareli و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند ذرات کوچکتر در امولسیون بیشتر توزیع شده و سبب افزایش راندمان انکپسولاسیون می‌گردد (Frascareli et al., 2012). درتحقیق دیگری Rachmadi و همکاران (۲۰۱۵) که به درون پوشانی کورکومین و سیلیمارین با تهیه نانوامولسیون به روش اولتراسونیک پرداختند گزارش کردند که با افزایش فاز روغنی در تهیه نانوامولسیون‌ها کارایی درون پوشانی کاهش می‌یابد (Rachmadi et al., 2015). در این پژوهش با افزایش میزان روغن اندازه ذرات بیشتر و راندمان درون پوشانی کاهش یافت و همچنین با افزایش SOR اندازه ذرات کمتر و راندمان درون پوشانی افزایش یافت که با نتایج سایر محققان همخوانی دارد.

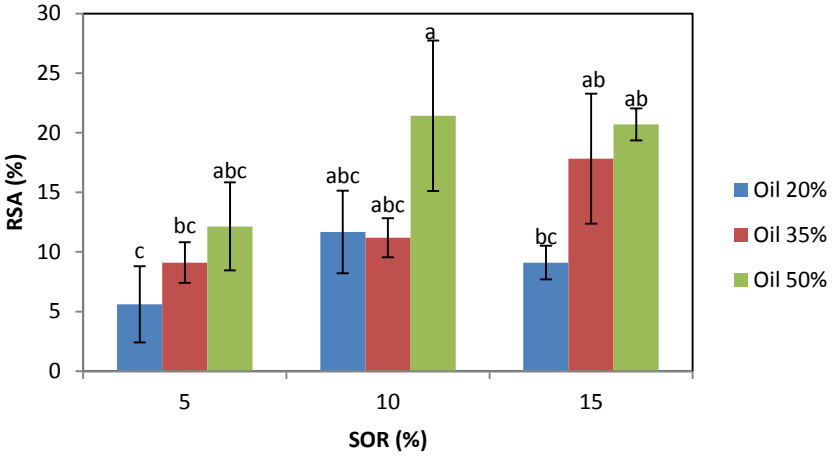


شکل ۱- تاثیر اثر متقابل روغن و SOR بر راندمان درون پوشانی نانوامولسیون‌ها

Fig. 1. Effect of oil and SOR interaction on the coating efficiency of nanoemulsions.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌ها

استفاده از رادیکال DPPH جهت بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی به یکی از پرکاربردترین روش‌های سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی تبدیل شده است. اساس این روش این است که رادیکال DPPH به‌عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند در نتیجه آن از DPPH رادیکالی به DPPH غیررادیکالی تبدیل می‌شود. در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌گردد. از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به‌وسیله طیف‌سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن پی برد (Chen et al., 2015). در شکل ۲ تاثیر متقابل روغن و SOR بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌ها مشاهده می‌شود.



شکل ۲- تاثیر متقابل روغن و SOR بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌ها

Fig. 2. Interaction of oil and SOR on the antioxidant activity of nanoemulsions

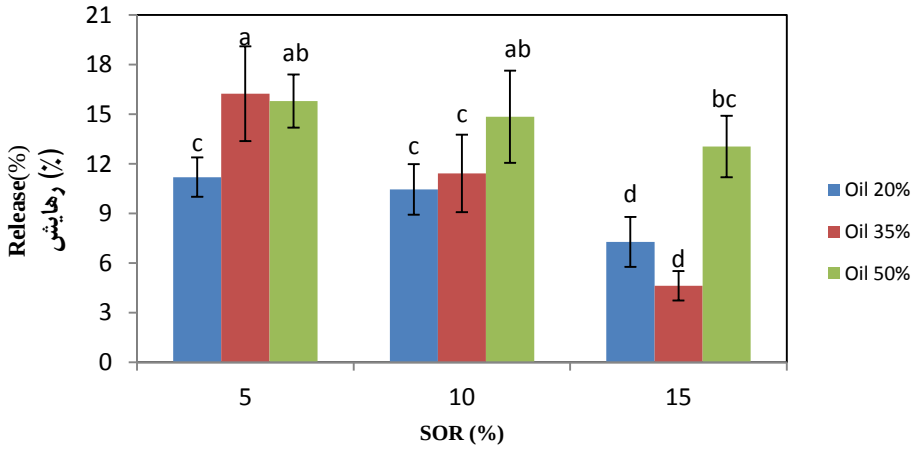
با بررسی آنالیز انجام شده بر نانوامولسیون‌ها مشاهده شد که با افزایش میزان روغن و SOR میزان فعالیت آنتی‌رادیکالی افزایش می‌یابد. دلیل افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت روغن با فرضیه "پارادوکس قطبیت آنتی‌اکسیدان[۱]" مرتبط است. در روغن چیا، بیشتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ساختار غیرقطبی دارند. ثابت شده است که این ترکیبات عملکرد بهتری را در سیستم‌های امولسیونی روغن در آب نسبت به روغن به تنهایی نشان می‌دهند. از آنجا که آنتی‌اکسیدان‌های موجود در روغن چیا خاصیت غیرقطبی دارند، می‌توانند به روغن متصل شوند و بهطور موثرتری در آنجا بمانند. می‌توان نتیجه گرفت که سیستم‌های امولسیونی ترکیبات فعال را که به‌طور معمول بسیار حساس به اکسیداسیون هستند، حفظ می‌کنند

۱ Polarity paradox of antioxidants

(Kiralan et al., 2014). نتایج این پژوهش با نتایج Kaya (۲۰۱۹) مطابقت دارد.

میزان رهایش

رهایش در واقع تعیین‌کننده این مسئله است که ماده فعال در چه زمانی و به چه میزانی آزاد می‌شود. رهایش پایین در نتیجه درون پوشانی بالا به‌دست می‌آید. در این پژوهش نشان‌دهنده درون پوشانی مناسب ماده روغن است. طبق آنالیز به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان رهایش نانوامولسیون‌ها مشاهده گردید با گذشت زمان نگهداری، میزان رهایش روغن نمونه‌ها افزایش می‌یابد به‌طوری که در ابتدای پژوهش به‌طور میانگین حدود ۹ درصد بوده و در انتهای پژوهش به حدود ۱۸ درصد به‌طور میانگین می‌رسد (شکل ۳). نمونه‌ها از پایداری بسیار زیادی برخوردار بودند که می‌توان دلیل آن را راندمان درون پوشانی بالا و اندازه ذرات پایین عنوان کرد. به‌طور کلی آنالیز داده‌ها برای این آزمایش نشان می‌دهد که میزان رهایش روغن با افزایش میزان روغن افزایش یافته و با افزایش SOR میزان رهایش کم شده است. نانوامولسیون‌های O/W قطرات پراکنده روغن در آب هستند که ماهیت آنها ناپایدار است و در واقع انرژی آزاد گیبس طی تشکیل نانوامولسیون مثبت است. سورفکتانت‌ها با کاهش کشش بین سطحی در فصل مشترک آب و روغن، باعث کاهش این انرژی شده و کمک به تشکیل نانوامولسیون‌ها می‌کنند (Ghosh et al., 2009). بی‌تردید واضح‌ترین شرط برای پایداری نانوامولسیون‌ها، کافی بودن مقدار امولسیفایر برای تشکیل دست کم یک تک لایه روی قطرات فاز پراکنده است (Wilkinson et al., 1994). حداقل غلظت لازم سورفکتانت برای تشکیل امولسیون، غلظت بحرانی میسلی شدن (CMC) نامیده می‌شود. در غلظت‌های بالاتر از CMC سورفکتانت‌ها هم به صورت آزاد در محلول وجود دارند و هم به صورت خودبه‌خودی تشکیل میسل می‌دهند. این مسئله یک تعامل دوگانه است زیرا از یک سو هر جا که خطر شکسته شدن لایه سورفکتانت دور قطرات روغن باشد، سورفکتانت‌های آزاد به‌صورت امولسیون کننده‌های یدکی استفاده شده و به ترمیم فصل مشترک کمک می‌کنند و همینطور وجود میسل‌ها و سورفکتانت‌های آزاد باعث افزایش گرانروی فاز پیوسته و در نتیجه پایداری بیشتر امولسیون می‌شود (Gharenaghadeh et al., 2017).پایداری بیشتر نانوامولسیون در واقع به معنای کاهش رهایش میزان روغن موجود در ساختار نانوامولسیون از آن می‌باشد. بنابراین بدین دلیل با افزایش SOR رهایش کاهش یافته و قابل توجیه می‌باشد.هرچه غلظت فاز پراکنده بیشتر شود، کسر حجمی افزایش یافته واختلاف دانسیته میان فازهای پراکنده و پیوسته بیشتر شده و مطابق قانون استوکس، سرعت دو فاز شدن افزایش می‌یابد(Faraji et al., 2020). افزایش مقدار فاز روغنی باعث افزایش میانگین اندازه ذرات می‌گردد و مطابق قانون استوک افزایش در قطر ذرات، صعود ذرات بر سطح نمونه‌ها را تسریع نموده و به همین دلیل با افزایش میزان روغن رهایش افزایش می‌یابد.



شکل ۳- تاثیر اثر متقابل روغن و SOR بر رهایش نانوامولسیون‌ها
Fig. 3. Effect of oil and SOR interaction on the release of nanoemulsions

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان گفت که روغن دانه چیا حاوی درصد بالایی اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد و از میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار زیادی (۸۸/۴۳٪) برخوردار است که این میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ساختار نانوامولسیون‌های روغن در آب بهتر حفظ می‌گردد. نتایج دیگر این پژوهش نشان‌دهنده این است که میزان روغن و SOR بر ویژگی‌های نانوامولسیون از جمله

اندازه ذرات بسیار مهم بوده به این ترتیب که با افزایش میزان روغن رابطه مستقیم و با SOR رابطه عکس دارد و در آزمون راندمان درون پوشانی، افزایش میزان روغن منجر به کاهش و افزایش SOR باعث افزایش راندمان می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز با افزایش میزان روغن و SOR رابطه مستقیم دارد و نمونه‌های تولیدی از پایداری زیادی برخوردار بودند.این پژوهش نشان داد که با استفاده از هموژنایزر اولتراسونیک می‌توان با میزان SOR پایین، نانوامولسیون‌های با اندازه ذرات کمتر از ۱۵۰ نانومتر، با راندمان درون پوشانی بالا و رهایش کم در طی زمان و پایداری زیاد تولید کرد. با توجه به محاسن گفته شده، استفاده از نانوامولسیون‌های این روغن گزینه مناسبی برای غنی‌سازی نوشیدنی‌های غیرشفاف می‌باشد.

منابع

1. Abdollahi, A., ShafafiZenozian, M., Saeedi Asl, M., Armin, M., Big Babaei, A. (2018). 'Investigation of the effect of microwave pretreatment on physicochemical properties of sesame seed oil', *Innovation in Food Science and Technology*, 10 (2), pp. 13-21.
2. Akinfenwa, A. O., Cheikhyoussef, A., Cheikhyoussef, N. Hussein, A. A., (2020). Cold pressed chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil. In Cold Pressed Oils (pp. 181- 190). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818188-1.00015-3
3. Anacleto, S., Ruiz, G., Rana, J., Gordillo, G., West, H., Sharma, M., et al. (2016). Chia crop (*Salvia hispanica* L.): Its history and importance as a source of polyunsaturated fatty acids omega-3 around the world: A review. *Journal of Crop Research and Fertilizers*, 1(104), 1–9
4. Assadpour, E., Maghsoudlou, Y., Jafari, S. M., Ghorbani, M., Aalami, M., (2016). Optimization offolic acid nano-emulsification and encapsulation by maltodextrin-whey protein double emulsions. *Int. J. Biol. Macromol*. 86, 197–207.
5. Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, (34), 1366– 1371. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.007
6. Bushway, A., Belyea, P. R., & Bushway, R. J. (1981).Chia Seed as a Source of oil, polysaccharide, and protein. *Journal of Food Science*, (46), 1349- 1350. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04171.x
7. Chahardoli, M., Ahmadichenarbon, H. (2017). Evaluation of nutritional value of chia seeds (*Hispanica Salvia* L). First International Conference on Applied Research in Agricultural Sciences, Natural Resources and Environment, https://civilica.com/doc/674104
8. Chen, H., Guan, Y., Zhong, Q. (2015). Microemulsions based on a sunflower lecithin–Tween 20 blend have high capacity for dissolving peppermint oil and stabilizing coenzyme Q10. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(3), 983-989. https://doi.org/10.1021/jf504146t
9. Faraji, N., Alizadeh, M., Almasi, H., Pirsa, S., Faraji, S. (2020). Optimization of Iranian *mentha longifolia* of nanoemulsion containing omega-3 fatty acids by spontaneous emulsification, *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17(1), 143-172.
10. Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V., Hubinger, M. D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulationof coffee oil by spray drying. *Food and bioproducts processing*, 90(3), 413- 424. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.002
11. Gharenaghadeh, s., Samadlouie, H. R., Sowtim., Hamisekarh., Rezaei Mokaram, R., (2017). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of Salvia essential oil nanoliposome (*Salvia multicaulis*), *Food Science and Technology*, 14(1), 271-282. magiran.com/p1665862
12. Ghosh, A., Mandal, A. K., Sarkar, S., Panda, S. Das, N. (2009). Nanoencapsulation of quercetin enhances its dietary efficacy in combating arsenic-inducedoxidative damage in liver and brain of rats. *Life Sciences*, 84: 75- 80. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.11.001
13. Hadian, J., Kohzadi, B., Asadi, M., ShafieZargar, A. R., Ghorbanpour, M. (2019). Evaluation of growth, yield characteristics and oil components of two Chia (*Salvia hispanica* L.) varieties in different planting dates, *Journal of Medicinal Plants*, 18(70), 59- 72. DOI: 10.29252/jmp.2.70.59
14. Hernandez, L. M. (2012). Mucilage from chia seeds (*Salvia hispanica*): Microestructure, physico-chemical characterization and applications in food industry (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Catolica De Chile).
15. Iglesias-Puig, E. and Haros, M., (2013). Evaluation of performance of dough and bread incorporatingchia (*Salvia hispanica* L.). *European Food Research and Technology*, vol. 237, 2013, pp.1- 10. https://doi.org/10.1007/s00217-013-2067-x
16. Imani Motlagh, Y., Gharachorloo, M. (2020). Chemical evaluation of oil extracted from chia Seed (*Salvia hispanica* L.), *Journal of Food Technology & Nutrition*, 18(1), 27-36.

17. Iranian Institute of Standards and Industrial Research., 2004, Analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography. Iranian National Standard No. 4091
18. Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W., Nolasco, S. M. and Tomás, M. C., (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (2), pp.166- 174. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.006
19. Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. Bhandari, B., (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food hydrocolloids*, 22 (7), pp.1191- 1202. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.006
20. Kaya, E. C. (2019). Formulation and characterization of chia seed oil nanoemulsions (Doctoral dissertation, Middle East Technical University).
21. Kiralan, S. S., Doğu-Baykut, E., Kittipongpittaya, K., McClements, D. J. and Decker, E. A., (2014). Increased antioxidant efficacy of tocopherols by surfactant solubilization in oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (43), pp.10561- 10566.
22. Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. D. V., Chiaramoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food research international*, 44(9): 3039- 3046. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.025
23. Martínez, M. L., Marín, M. A., Faller, C. M. S., Revol, J., Penci, M. C., &Ribotta, P. D. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: study of processing parameters. *LWT- Food Science and Technology*, 47(1), 78- 82. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.032
24. McClements, D, J. and Rao, J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51: 285- 330. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558
25. NutraLease (2011). Available from: http://www.nutralease.com/Nutra/ Templates/ showpage. asp ?DBID= 1&LNGID= 1&TMID= 84&FID= 767
26. Rachmadi U. W., Permatasari. D, Rahma. A., Rachmawati. H., (2015). Self- nanoemulsion containing combination of curcumin and silymarin: Formulation and characterization. *Research and Development on Nanotechnology in Indonesia* 2(1): 37- 48.
27. Ribeiro, R. C. D. A., Barreto, S. M. A. G., Ostrosky, E. A., Rocha-Filho, P. A. D., Veríssimo, L. M., and Ferrari, M. (2015). Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) mill extract as moisturizing agent. *Molecules*, 20 (2), 2492- 2509. https://doi.org/10.3390/molecules20022492
28. Saberi, A. H., Fang, Y. and McClements, D. J., (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 391, pp.95- 102. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.069
29. Tavakolipour, H., Mokhtarian M, (2016). Nano-encapsulation of pomegranate seed oil by liquid- liquid dispersion method and oil releasing in gastric simulated conditions, *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 11(2), 75-84. magiran.com/p1559678
30. Timilsena, Y. P., Vongsvivut, J., Adhikaria, R. & Adhikari, B. (2017). Physicochemical and thermal characteristics of Australian chia seed oil. *Food Chemistry*, (228), 394– 402. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.021
31. Uluata, S., McClements, D. J. Decker, E. A. (2015). Physical stability, autoxidation, and photosensitized oxidation of ω-3 oils in nanoemulsions prepared with natural and synthetic surfactants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(42), 9333- 9340. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03572
32. Velasco, L. Fernandez- Martinez, J. M. (2002).Breeding oilseed crops for improved oil quality. *Journal of Crop Production*, *5*(1-2), 309-344. https://doi.org/10.1300/J144v05n01_13
33. Venkadesaperumal, G., Rucha, S., Sundar, K., and Shetty, P. H. (2016). Anti-quorum sensing activity of spice oil nanoemulsions against food borne pathogens. *LWT- Food Science and Technology*, 66, 225- 231. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.044
34. Wilkinson, J. B., (1994). Harry'sCosmeticology. 7 ed: Longman Scientific and Technical.
35. Wooster, T. J., Golding, M. and Sanguansri, P., (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability. Langmuir, 24(22), pp.12758- 12765. https://doi.org/10.1021/la801685v

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 307- 329

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۲۹-۳۰۷

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Production of low-fat doughnut using triticale flour and Basil gum and investigation of the effect of green cardamom essential oil on its shelf life

Zahra Sheikholeslami[1*], Mahdi Karimi[1], Bahareh Sahraiyan[2]

Received: 2020.11.11
Accepted: 2021.07.17

How to cite this article:
Sheikholeslami, Z., Karimi, M., Sahraiyan, B. (2022). Production of low-fat doughnut using triticale flour and Basil gum and investigation of the effect of green cardamom essential oil on its shelf life. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 307-329.

Abstract

Introduction: Doughnuts are fried foods that absorb significant amounts of oil, and commercial doughnuts made from wheat flour typically contain 24 to 26 percent oil. Fresh doughnut is soft and has a pleasant taste and aroma. One of the main ways to enrich bakery products is to mix wheat flour with other flours. Triticale has a higher percentage of protein compared to wheat, rice, corn, rye and oats and is in good condition in terms of essential amino acids. Lysine in triticale is higher than wheat and less than rye. Also triticale has the same amount of vitamins as wheat. The positive properties of gums extracted from native seeds such as basil can be used to reduce oil absorption and improve shelf- life of fried bakery products. Basil seeds are soaked in water due to the presence of polysaccharides, the outer pericarp swells and turns into a gelatinous substance. Green cardamom with scientific name of *Elettaria cardamomum* belongs to Zingiberaceae family. Cardamom is one of the most widely used aromatic condiments in some foods, breads, sweets, especially jams. 23 compounds have been identified in green cardamom essential oil, the highest composition (31.53%) belonging to Eucalyptol. Therefore, in this study, enrichment the wheat flour of fried fermented doughnuts by replacing part of wheat flour with triticale flour, reducing oil absorption by using basil seed gum and improving antioxidant and sensory properties and reducing fungal activity in the presence of green cardamom essential oil were investigated.

Material and Methods: In the first part of this research, Triticale flour at 0, 15 and 30% and Basil seed gum at 0, 0.50 and 1% were used to improve the quality and decrease oil absorption of fermented doughnut. Control doughnut formulation had 500 g wheat flour, 20 g milk powder, 4 g salt, 80 g oil, 12 g baker's yeast, 80 g sugar, 500 ml water, 100 g egg and 1 g vanilla, 1.5 % guar gum and 0.5 % xanthan gum. Moisture, specific volume, porosity, firmness, crust color and oil absorption were evaluated. To study the effect of processing parameters on crust color components of doughnut, the RGB color space images were converted to L^*a^*b space. For determination of doughnut porosity using image analysis, the color images were first gray scaled and then thresholded using isodata algorithm. The porosity was measured from the ratio of white to the total numbers of pixels. Results were reported as the average of three replications. In the second part of this research, *Cardamomum* essential oil at 0, 50, 100, 150 and 200 ppm were used to improve antioxidant and sensory properties and decrease microbial contamination of doughnut. . In order to assess significant differences among samples, a complete randomized design of triplicate analyses of samples was performed using the Mini-Tab17. Tukey's new multiple range tests were used to study the statistical differences of the means with 95% confidence.

Result and Discussion: The results of the first part showed that the sample contained 15% triticale flour and 0.50% gum with the highest specific volume (3.4 cm^3g^{-1}) and porosity (0.81) and the lowest firmness after one week of storage (11.91 N) and was introduced as the best example of the first part. Also, the results of oil absorption showed a decrease of 29.83% in the selected sample (0.17 g/g dry matter) compared to the control sample (0.24 g/g dry matter). The

1. Associate professor of Agricultural Engineering Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.
2. Food Quality and Safety Research Department, ACECR, Khorasan Razavi Branch, Iran.
(*Corresponding Author Email: Zahrasheikholeslami@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67239.0

moisture content of the mentioned sample was 21.09% one week after production and L^*, a^* and b^* of crust color was 55.27, 8.86 and 11.91, respectively. Brightness and redness of this sample was more than the control. The results of second part showed that cardamom essential oil had antioxidant activity in all concentrations. Also, the results indicated the concentrations of more than 50 ppm of cardamom essential oil can be considered as an antifungal agent and inhibit positive growth in doughnut. The microbial load of samples containing 100, 150 and 200 ppm had 3.97, 3.81 and 2.94 log cfu g^{-1} after 15 days of production, respectively. The microbial load of these samples was 51.05, 53.03 and 63.75% less than the sample without essential oil (10.11 log cfu g^{-1}). Finally, the results of sensory evaluation showed that the sample containing 15% triticale flour, 0.50% basil seed gum and 100 ppm cardamom essential oil had the highest overall acceptance score and this sample is introduced as the best sample of this study.

Keywords: Doughnut, Oil content, Basil seed gum, Triticale flour, Antioxidant.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 307- 329

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۲۹-۳۰۷

مقاله علمی-پژوهشی

تولید دونات کم‌چرب با استفاده از آرد تریتیکاله و صمغ ریحان ضمن بررسی تأثیر اسانس هل سبز بر ماندگاری آن

زهرا شیخ‌الاسلامی[1*]- مهدی کریمی[1]- بهاره صحرائیان[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۶

چکیده

هدف از این پژوهش جایگزینی آرد گندم (صفر، ۱۵ و ۳۰ درصد) با آرد تریتیکاله در دونات بود که به‌منظور بهبود ویژگی‌های دونات از صمغ ریحان (صفر، ۰/۵۰ و ۱ درصد) و اسانس هل سبز (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) استفاده شد. نتایج نشان داد، نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ دارای بیشترین حجم مخصوص (۳/۴ سانتی‌مترمکعب بر گرم) و نسبت شاخص تخلخل (۰/۸۱) و کمترین سفتی بافت پس از یک هفته نگهداری (۱۱/۹۱ نیوتن) بود و به‌عنوان بهترین نمونه معرفی شد. همچنین نتایج حاکی از کاهش ۲۹/۸۳ درصدی محتوی روغن بهترین نمونه در مقایسه با شاهد بود. رطوبت نمونه ذکر شده یک هفته پس از تولید ۲۱/۰۹ درصد و میزان مؤلفه رنگی L^*، a^* و b^* آن به‌ترتیب ۵۵/۲۷، ۸/۸۶ و ۱۱/۹۱ بود. نتایج فاز دو نشان داد، اسانس هل سبز در تمامی غلظت‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند. نتایج شمارش کپک و مخمر نیز حاکی از آن بود میزان رشد کپک و مخمر نمونه‌های حاوی۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس هل طی ۱۵ روز نگهداری در مقایسه با نمونه فاقد اسانس به‌ترتیب ۵۱/۰۵، ۵۳/۰۳ و ۶۳/۷۵ درصد کمتر بود. بهترین نمونه به لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رشد کپک و مخمر نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس بود. اما نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس از بیشترین امتیاز پذیرش کلی، کمترین میزان محتوی روغن و سفتی بافت، بیشترین حجم و تخلخل برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: دونات، محتوی روغن، صمغ ریحان، آرد تریتیکاله، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

دونات تخمیری نوعی شیرینی آردی است که از سرخ‌کردن خمیر تخمیر شده در روغن تهیه می‌شود. دونات تازه نرم و دارای مزه و عطر مطلوب است. ویژگی‌های حسی مطلوب در دونات در نتیجه فرآیند سرخ کردن با ایجاد پوسته ترد با رنگ قهوه‌ای روشن و بخش داخلی با بافتی متخلخل و نرم حاصل از ژلاتیناسیون نشاسته ایجاد می‌گردد. دونات به دلیل تنوع مواد اولیه می‌تواند ماده غذایی مناسبی جهت غنی‌سازی و تولید یک محصول فراسودمند باشد. استفاده از ترکیبات هیدروکلوئیدی به‌عنوان افزودنی خشک، یک روش کاربردی مناسب برای کاهش محتوی روغن و حفظ رطوبت محصول در هنگام می‌باشد (Funami et al., 1999).

ریحان یک گیاه یکساله با شاخه‌های کوچک و آرومای مطلوب بوده که در ایران رشد می کند. این گیاه در بسیاری از مناطق دنیا به خصوص مناطق گرمسیری آسیا، آفریقا و آمریکای جنوبی و مرکزی رشد می‌کند (Azuma & Sakamoto, 2003) وقتی دانه ریحان در آب خیسانده می‌شود به دلیل وجود مواد پلی‌ساکاریدی، پریکارپ بیرونی متورم شده و به یک ماده ژلاتین مانند تبدیل می‌شود و تحقیقات نشان داده‌اند که پلی ساکاریدهای استخراج شده از دانه ریحان شامل دو بخش اصلی گلوکومانان (۴۳ درصد) با اتصالات عرضی (۱←۴) و گزیلان (۲۴/۳۹ درصد) و همچنین دارای بخش کوچکی از گلوکان (۲/۳۱ درصد) است. علاوه بر این حضور آرابینوگالاکتان بسیار منشعب همراه با گلوکومانان و گزیلان گزارش شده است (Sciarini et al, 2009).

Ghorbani و همکاران (۲۰۱۸) از صمغ دانه ریحان در دونات روغنی استفاده نمودند و حضور این صمغ را در فرمولاسیون بر بهبود بافت، تخلخل، حجم، رنگ و ویژگی‌های حسی گزارش کردند. از

۱- دانشیار، بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
۲- گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: Zahrasheikholeslami@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.67239.0

سایر افزودنی‌ها و انواع ترکیبات هیدروکلوئیدی به‌منظور کاهش محتوی روغن در دونات نیز استفاده شده است (Ghorbani et al., 2018). Sabbaghi (۲۰۲۱) کاربرد ترکیبات هیدروکلوئیدی (زانتان و کربوکسی متیل سلولز) در فرمولاسیون دونات با هدف کاهش محتوی روغن بررسی نمود. نتایج این محقق نشان داد که، رطوبت نمونه‌ها با افزایش درصد ترکیبات هیدروکلوئیدی افزایش یافت. محتوی روغن با افزایش درصد صمغ کاهش یافت و کمترین محتوی روغن در نمونه های حاوی صمغ زانتان مشاهده شد. این محقق گزارش نمود زانتان به دلیل تشکیل ژل حرارتی و غلیظ شوندگی بیشترین کاهش محتوی روغن را در احتباس آب در هنگام تماس محصول با روغن داغ دارا است (Sabbaghi et al., 2021). Kwinda و همکاران (۲۰۱۸) تاثیر سبوس جو دوسر و فیبر غلاف بارهنگ کتانی روی کاهش روغن و خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماگواینیا (خمیر سرخ‌شده بر پایه غلات) را بررسی نمودند. دو روش سنتی و اصلاح‌شده فرآوری این محصول با هم مقایسه شدند. استفاده از این افزودنی‌ها میزان محتوی روغن را در روش اصلاح‌شده نسبت به روش سنتی به‌طور معنی‌داری کاهش داد. سبوس جو دوسر و فیبر غلاف بارهنگ کتانی به‌ترتیب ۳ و ۲ درصد خصوصیات بافتی را بهبود بخشیدند (Kwinda et al., 2018). Kante-Traore و همکاران (۲۰۱۸) دو فرمولاسیون مختلف دونات مانگو و روش فرآوری را بررسی نمودند. فرمولاسیون پالپ مانگو در ترکیب با آرد رنج و ذرت بررسی شد. هر دو فرمولاسیون با دو روش لقمه سوخاری با سوخت گاز[1] (خمیر غوطه‌ور در روغن) و کریپ میکر[2] (خمیر روی صفحه داغ) تحت شرایط کنترل‌شده فرآوری شدند. نتایج نشان داد که محتوی رطوبت دونات‌های مانگو با استفاده از سرخ‌کن گازی که شامل ذرت یا آرد برنج بودند به میزان معنی‌داری کمتر از فرمولاسیون‌های یکسان با استفاده از کریپ میکر بود. بالاترین محتوی چربی برای دونات حاوی آرد برنج و آرد ذرت به‌ترتیب برابر با ۲۵/۳۴ و ۲۹/۷۸ درصد بود. محتوی بتا-کاروتن دونات‌های فرآوری شده با روش کریپ میکر به‌طور معنی‌داری بالاتر از دونات‌های سرخ‌شده در روغن بود (Kante-Traore et al., 2018). Sakhale و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر هیدروکلوئیدهایی مانند کربوکسی متیل سلولز، هیدروکسی پروپیل متیل سلولز، صمغ زانتان و صمغ گوار را روی کاهش محتوی روغن ساموسا بررسی کردند. این هیدروکلوئیدها به آرد گندم در ساموسا به نسبت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد برحسب وزن خشک اضافه شدند. نتایج نشان داد که صمغ زانتان در سطح ۱/۵ درصد به میزان قابل توجهی نسبت به سایر هیدروکلوئیدها محتوی روغن را کاهش می‌دهد (۸/۵۶ درصد). همچنین صمغ زانتان به همراه کربوکسی‌متیل‌سلولز نیز به‌طور معنی‌داری محتوی روغن را کاهش داد (۹/۳۸ درصد). با افزایش میزان هیدروکلوئیدها نیز محتوی روغن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، همچنین حضور صمغ زانتان موجب بهبود خصوصیات کیفی و ارزیابی حسی نیز شد (Sakhale et al., 2011). Lim و همکاران (۲۰۱۲) از پلی‌گاما گلوتامیک اسید جهت کاهش محتوی روغن در دونات استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش سطح پلی گاما گلوتامیک اسید از ۰/۲۵ تا ۱ گرم به ازای ۱۰۰ گرم خمیر؛ محتوی روغن در محصول تا پنج برابر کاهش یافت. تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از دونات‌های حاوی ۱ گرم گاماگلوتامیک اسید حفرات کمتر و ماتریکس متراکم‌تری را نشان داد و تمامیت ساختاری آن بهبود یافته بود و همچنین نتایج ارزیابی حسی مطلوبی نیز نشان داد (Lim et al., 2012).

یکی از اصلی‌ترین راهکارهای غنی‌سازی آردها، اختلاط آرد گندم با سایر آردهاست. هدف اصلی از این اختلاط، افزایش ترکیبات معدنی، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و فیبرهای رژیمی در محصول نهایی است. تریتیکاله با نام علمی *X triticosecale wittmack* اولین غله‌ای است که به دست انسان از تلاقی گندم جنس *Triticum* و چاودار جنس *Secale* می‌باشد (Najaf Najafii et al.. 2008). تریتیکاله در مقایسه با گندم، برنج، ذرت، چاودار و یولاف درصد پروتئین بیشتری دارد. مقدار اسید آمینه لیزین تریتیکاله از گندم بیشتر و از چاودار کمتر است. همچنین تریتیکاله تا حدودی مواد معدنی بیشتر و میزان ویتامین برابر با گندم دارد (Zannini & Elke, 2013). ترتیکاله حاوی چربی فسفاته و غیرآزاد بیشتری نسبت به گندم است که این خصوصیت خود را از چاودار به ارث برده است. این غله نیز به‌عنوان منبعی غنی از پروآنتیوسیانیدین، لیگنان‌ها و اسیدهای فنولیک مشخص شده است (Ghushji, 2000).

از دیگر اهداف تحقیق پیش رو بهره‌مندی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس هل سبز در دونات تخمیر حاوی آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بود. هل سبز با نام علمی *Elettaria cardamomum*، متعلق به تیره زنجبیلیان است. انواع هل شامل هل سبز و هل سفید است که نوع سبز آن عطر تندتری دارد. هل یکی از پرکاربردترین چاشنی‌های معطر مورد استفاده در بعضی از غذاها، نان‌ها، شیرینی‌ها، به خصوص مرباهاست. اثر ضدمیکروبی هل توسط برخی از دانشمندان نظیر Kubo و همکاران (۱۹۹۱)، El Malti و همکاران (۲۰۰۷)، Kaushik و همکاران (۲۰۱۰) و Husain و Ali (۲۰۱۴) گزارش شده است. همچنین Noshad و Alizadeh Behbahani (۲۰۱۹) به شناسایی ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تأثیر ضدمیکروبی اسانس هل سبز بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. این

1 Gas-fueled fritter
2 Crepe maker

محققان ۲۳ ترکیب در اسانس هل سبز شناسایی نمودند که بیشترین ترکیب (۳۱/۵۳ درصد) مربوط به Eucalyptol بود. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس هل سبز براساس درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد برابر با ۴۳ و حداقل غلظت مهارکنندگی رادیکال این اسانس بین ۳۲-۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بسته به نوع باکتری (گرم مثبت و منفی) گزارش شد.

بنابراین هدف از فاز اول این پژوهش غنی‌سازی دونات تخمیری سرخ شده و کاهش محتوی روغن با جایگزینی بخشی از آرد گندم با آرد تریتیکاله (۱۵ و ۳۰ درصد) و استفاده از صمغ دانه ریحان (سطوح مصرفی ۰/۵ و ۱ درصد براساس وزن آرد) بود. در فاز دوم این تحقیق به بررسی افزودن اسانس هل سبز (در سطوح صفر، ۳۰، ۶۰ و ۱۰۰ پی پی ام) به بهترین نمونه دونات حاوی آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان (بر اساس کمترین سفتی بافت و محتوی روغن و بیشترین میزان حجم و تخلخل) پرداخته شد و عملکرد این اسانس بر ویژگی‌های حسی و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و میکروبی محصول هدف بررسی گردید.

جدول ۱- نمونه‌های دونات در فاز اول و دوم پژوهش

Table 1- Samples of doughnuts in the first and second phases of the research

First Phase فاز اول		
Basil seed gum (based on dry matter content of the dough) صمغ دانه ریحان (براساس درصد ماده خشک خمیر)	Flour type (%) نوع آرد (درصد)	
	Triticale تریتیکاله	Wheat گندم
0	0	100
0.50	0	100
1	0	100
0	15	85
0	30	70
0.50	15	85
1	15	85
0.50	30	70
1	30	70
Second Phase فاز دوم		
Green cardamom essential oil (ppm) اسانس هل سبز (پی‌پی‌ام)	Treatment تیمارها	
0 (Control 1)	The sample contains 100% wheat flour and does not contain basil gum نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم و فاقد صمغ ریحان	
0 (Control 2)	*** The best treatment of phase one ***بهترین نمونه فاز یک	
50	The best treatment of phase one بهترین نمونه فاز یک	
100	The best treatment of phase one بهترین نمونه فاز یک	
150	The best treatment of phase one بهترین نمونه فاز یک	
200	The best treatment of phase one بهترین نمونه فاز یک	

*** بهترین نمونه دونات در فاز اول براساس کمترین سفتی بافت و محتوی روغن و بیشترین میزان تخلخل و حجم مخصوص انتخاب می‌شود.

*** The best doughnuts sample in the first phase is selected based on the least firmness of the texture and oil content and the highest amount of porosity and specific volume.

مواد و روش‌ها

آرد نول از کارخانه آرد رضا و آرد تریتیکاله رقم سناباد از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شد. تخم‌مرغ تازه نیز یک روز قبل از تولید تهیه و در یخچال

نگهداری شد. همچنین مخمر خشک فعال (*ساکارومایسس سروزیه*[۱]) از کارخانه رضوی (مشهد، ایران) و سایر مواد نظیر شکر، روغن مایع، شیرخشک و هل سبز از یک فروشگاه عرضه‌کننده مواد اولیه قنادی، وانیل (رودیا، فرانسه) و صمغ دانه ریحان از شرکت ریحان گام (گرگان، ایران) خریداری شد.

تهیه اسانس هل سبز

هل سبز پس از خریداری با آب سرد شسته شد و پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه (۳۰ –۲۵ درجه سانتی‌گراد) توسط آسیاب (مولینکس، AR110O10) پودر و از الک با مش ۸۰ عبور داده شد و در کیسه‌های پلی‌اتیلنی نگهداری گردید. به‌منظور تهیه اسانس هل سبز از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استفاده شد. بدین منظور ۵۰ گرم از پودر هل سبز و ۷۵۰ میلی‌لیتر آب به دستگاه کلونجر اضافه شد و عمل استخراج اسانس طی ۴ ساعت انجام شد. سپس آبگیری اسانس به‌وسیله سولفات سدیم انجام شد. اسانس استخراجی تا انجام آزمایشات در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه دونات

به‌منظور تهیه دونات در فاز اول این تحقیق آرد گندم (۵۰۰، ۴۲۵ و ۳۵۰ گرم) و آرد تریتیکاله (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ گرم) به همراه سایر مواد پودری شامل شیرخشک (۲۰ گرم)، نمک (۴ گرم)، وانیل (۱ گرم)، صمغ دانه ریحان (صفر، ۰/۵۰ و ۱ درصد براساس درصد ماده خشک خمیر) مخلوط و دوبار الک شدند. در ادامه روغن (۸۰ گرم) اضافه و مواد به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه مخلوط گردیدند. سپس محلول مخمر اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه مخلوط کردن ادامه یافت. محلول مخمر شامل مخمر (۱۲ گرم)، آرد (۵۰ گرم)، شکر (۸۰ گرم) و آب (۱۰۰ سی‌سی) بود. جهت فعال‌سازی مخمر، محلول تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط (۳۰ –۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت.

در ادامه تخم‌مرغ (۱۰۰ گرم) به مخلوط قبلی اضافه و به مدت ۲ دقیقه عمل مخلوط کردن انجام شد. در انتها آب و آب لیمو (۱۰ سی سی) اضافه و خمیر آماده شده به‌صورت دستی با ضخامت ۱ سانتی‌متر پهن شد و با قالب از جنس استیل که به‌ترتیب دارای قطر داخلی و خارجی ۲/۵ و ۶ سانتی‌متر بود، قالب‌زنی شد. همچنین مرحله تخمیر به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰ درصد انجام شد و بعد از آن نمونه‌ها در سرخ‌کن به مدت ۴ دقیقه با دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد سرخ شدند. مخزن سرخ‌کن با ۱/۵ لیتر روغن پر شد، به‌منظور تثبیت و پایدار شدن دمای روغن، ۱ ساعت قبل از شروع سرخ کردن، روشن خواهد شد. نمونه‌های تولیدی پس از سرد شدن در دمای محیط (۳۰– ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه در پوششی از جنس پلی‌اتلین بسته‌بندی و نگهداری شد (Zolfaghari *et al.*, 2013). لازم به ذکر است که روغن سطحی دونات پس از سرخ کردن و قبل از سرد شدن با استفاده از کاغذ جاذب جدا شد. در فاز دوم پژوهش پیش رو، به فرمول بهترین نمونه دونات (انتخابی از فاز اول) سطوح متفاوت اسانس هل (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) افزوده شد. بهترین نمونه دونات در فاز اول براساس کمترین سفتی بافت و محتوی روغن و بیشترین میزان تخلخل و حجم مخصوص انتخاب شد و به‌عنوان یکی از دو شاهد فاز دوم در نظر گرفته شد. شاهد یک در دومین بخش در واقع نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم بود.

رطوبت

جهت اندازه‌گیری رطوبت از استاندارد AACC (2000)، شماره ۱۶– ۴۴ استفاده گردید. برای این منظور نمونه‌ها در فاصله زمانی ۲ ساعت، ۳ روز و یک هفته پس از تولید در آون (Jeto Tech، OF-O2G، کره جنوبی) با حرارت ۱۰۵– ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

اندازه‌گیری محتوی روغن

نمونه‌های سرخ شده و خنک شده به قطعات کوچکتر (۱۶– ۱۲ گرم) بریده شدند و در آن هوای داغ (Jeto Tech، OF-O2G، کره جنوبی) در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردیدند. نمونه خشک شده توسط آسیاب برقی خرد شد، جرم نسبی روغن برحسب ماده خشک بدون روغن مطابق رابطه (۱) محاسبه شد. در این رابطه W_1 وزن ثابت اولیه بالن، W_2 وزن نهایی بالن پس از استخراج و m وزن نمونه خشک شده بر حسب گرم است و O میزان روغن جذب شده برحسب ماده خشک ($g\ g^{-1}$, db) محاسبه شد. میانگین محتوی چربی موجود در خمیر اولیه نیز محاسبه گردید و از این مقدار کسر شد.

$$O = \frac{W_1 - W_2}{m - O} \qquad (۱)$$

شاخص تخلخل

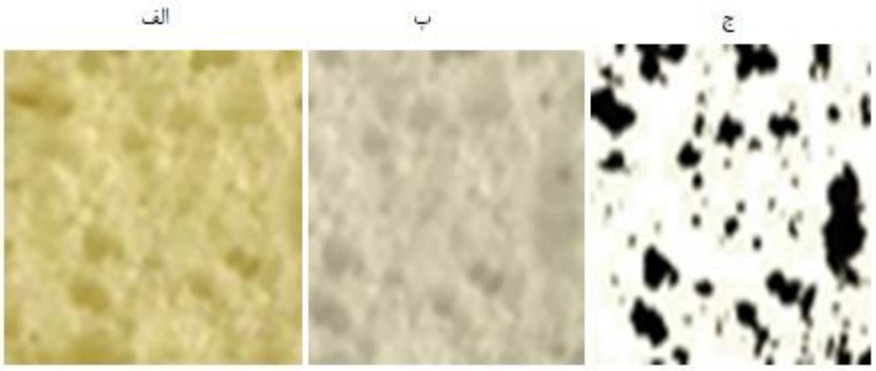
جهت اندازه‌گیری شاخص تخلخل، تصویر بافت درونی توسط نرم افزار ImageJ نسخه 1.6.0 پردازش شد. ابتدا تصویر اصلی (شکل ۱– الف) به تصویر ۸ بیتی (شکل ۱– ب) تبدیل شد و سپس تصویر

---

۱ *Saccharomyces cervisiae*

دودویی (شکل ۱- ج) ایجاد گردید. سپس، نسبت مساحت بخش‌های تیره (Sb) و روشن (Sw) در تصاویر دودویی محاسبه شد و شاخص تخلخل (p) مطابق رابطه ۲ به‌دست آمد.

$$p = \frac{S_b}{S_w} \quad (۲)$$



شکل ۱- تصویر اولیه (الف)، تصویر ۸ بیتی (ب) و تصویر دودویی (ج) جهت اندازه گیری شاخص تخلخل
Fig. 1. Primary image (a), 8-bit image (b) and binary image (c) to measure the porosity index

حجم مخصوص

برای اندازه‌گیری حجم مخصوص از روش جایگزینی حجم با دانه کلزا[1] مطابق با استاندارد AACC (2000)، شماره ۱۰- ۰۵ استفاده شد. برای این منظور در فاصله زمانی ۲ ساعت پس از پخت، قطعه‌ای به ابعاد ۲× ۲ سانتی‌متر از نمونه‌های تولیدی تهیه شد. ابتدا وزن قطعه مورد نظر توزین و سپس حجم آن اندازه‌گیری شد. در نهایت از تقسیم حجم بر وزن نمونه، حجم مخصوص براساس سانتی‌متر مکعب بر گرم تعیین شد.

سفتی بافت

بررسی بافت نمونه‌ها در بازه زمانی ۲ ساعت، ۳ روز و یک هفته پس از تولید با استفاده از دستگاه بافت‌سنج (QTS، CNS، Farnell، انگلستان) و توسط آزمون فشردن صورت گرفت. در این آزمایش ابتدا نمونه‌های دونات که به‌صورت برش‌های یکسان با ابعاد۲× ۲× ۲ سانتی‌متر توسط تیغ بریده شدند و روی صفحه نگهدارنده قرار گرفتند. سپس پروب دستگاه به اندازه ۴× ۴ سانتی‌متر و با سرعت ۱ میلی‌متر بر ثانیه شروع به حرکت کرد و پس از تماس با سطح نمونه، به اندازه ۷۵ درصد از ارتفاع اولیه نمونه را فشرده نمود (Pourhaji et al., 2011).

رنگ پوسته

آنالیز رنگ پوسته دونات در فاصله زمانی ۲ ساعت پس از تولید، از طریق تعیین سه شاخص L^*، a^* و b^* صورت پذیرفت. شاخص L^* معرف میزان روشنی نمونه می‌باشد و دامنه آن از صفر (سیاه خالص) تا ۱۰۰ (سفید خالص) متغیر است. شاخص a^* میزان نزدیکی رنگ نمونه به رنگ‌های سبز و قرمز را نشان می‌دهد و دامنه آن از ۱۲۰- (سبز خالص) تا ۱۲۰+ (قرمز خالص) متغیر است. شاخص b^* میزان نزدیکی رنگ نمونه به رنگ‌های آبی و زرد را نشان می‌دهد و دامنه آن از ۱۲۰- (آبی خالص) تا ۱۲۰ + (زرد خالص) متغیر می‌باشد (Sun., 2008). جهت اندازه‌گیری این شاخص‌ها ابتدا برشی به ابعاد ۲ در ۲ سانتی‌متر از دونات تهیه گردید و به‌وسیله اسکنر (HP Scanjet G3010) با وضوح ۳۰۰ پیکسل تصویربرداری شد. سپس تصاویر در اختیار نرم‌افزار Image J قرار گرفت. با فعال کردن فضای LAB در بخش Plugins، شاخص‌های فوق محاسبه شد (Sabbaghi et al., 2018).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH اندازه‌گیری شد (Larrauri et al., 1998). برای این منظور ۱۰۰ میکروگرم از نمونه خشک شده با ۱۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲ ساعت عصاره‌گیری شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۲/۹ میلی لیتر DPPH ۰/۱ میلی مولار مخلوط و به شدت تکان داده شد و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی عدد جذب نور در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد.

1 Rape seed displacement

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = (1-(\text{Sample absorbtion} - \text{Blank absorbtion})/\text{Control absorbtion}) \times 100 \quad (۳)$$

بلانک حاوی ۰/۱ میلی لیتر عصاره متانولی نمونه و ۲/۹ میلی‌لیتر حلال متانول بدون DPPH و کنترل شامل ۲/۹ میلی‌لیتر DPPH و ۰/۱ میلی‌لیتر حلال متانولی بدون عصاره نمونه بود.

کشت کپک و مخمر

جهت انجام این آزمایش از استاندارد AACC (2000)، شماره ۲- ۱۰۸۹۹ استفاده گردید. برای این منظور ۱۰ گرم از نمونه به ۹۰ گرم محلول استریل رینگر اضافه شد. به مدت ۵ دقیقه زمان داده شد تا مواد به‌صورت محلول در آمد. از محیط کشت YGC Agar استفاده شد. به مقدار ۱ میلی‌لیتر از مواد اولیه که در محیط کشت رینگر حل شده بود در پلیت‌های استریل ریخته و بعد به محیط کشت اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این آزمون بلافاصله پس از تولید و در روز سوم، ششم، نهم، دوازدهم و پانزدهم انجام شد.

ویژگی‌های حسی

بدین منظور ۱۰ ارزیاب انتخاب شدند. بدین منظور سه نمونه محلول ساکارز به تعدادی داوطلب (۳۰ نفر) جهت ارزیابی حسی داده شد. دو نمونه از محلول‌ها دارای غلظت یکسان و مشابه بودند و داوطلبان از این موضوع اطلاعی نداشتند. از بین داوطلبان، ۱۰ داور به دو نمونه مشابه اشاره کردند. بدین ترتیب ۱۰ ارزیاب منتخب آموزش دیدند و از توانمندی آن‌ها در ارزیابی حسی استفاده شد. خصوصیات حسی از نظر فرم و شکل (ضریب رتبه‌ای ۴)، پوسته (ضریب رتبه‌ای ۲)، تخلخل (ضریب رتبه‌ای ۲)، سفتی بافت (ضریب رتبه‌ای ۲)، قابلیت جویدن (ضریب رتبه‌ای ۳) و بو و مزه (ضریب رتبه‌ای ۳) ارزیابی شدند (Jalali et al., 2019). ضریب ارزیابی صفات براساس روش هدونیک پنج نقطه‌ای (۱: بسیار بد، ۲: بد، ۳: متوسط، ۴: خوب و ۵: خیلی خوب) بود. با داشتن این معلومات، پذیرش‌کلی با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد.

$$Q = \frac{\sum (P \times G)}{\sum P} \quad (۴)$$

Q= پذیرش‌کلی (عدد کیفیت دونات)، P= ضریب رتبه صفات و G= ضریب ارزیابی صفات

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در فاز اول تجزیه و تحلیل آماری جهت بررسی تأثیر آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بر میزان رطوبت، محتوی چربی، حجم مخصوص، تخلخل، سفتی بافت و شاخص‌های رنگی دونات از طرح ساده کاملا تصادفی با در نظرگیری ۹ تیمار فرمولاسیون به صورت شاهد (فاقد آرد تریتیکاله و صمغ)، صمغ دانه ریحان (در دو سطح ۰/۵۰ و ۱)، آرد تریتیکاله (در دو سطح ۱۵ و ۳۰) و ترکیبی آرد تریتیکاله و صمغ (در چهار سطح ۱۵: ۰/۵۰، ۱۵: ۱، ۳۰: ۰/۵۰ و ۳۰: ۱) انجام گرفت. در فاز دوم تجزیه و تحلیل آماری جهت بررسی تأثیر اسانس هل سبز بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، رشد کپک و مخمر و ویژگی‌های حسی از طرح کاملا تصادفی با در نظرگیری ۶ تیمار فرمولاسیون به صورت شاهد یک (نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم)، شاهد دو (بهترین نمونه فاز اول به لحاظ کمترین سفتی بافت و محتوی چربی و بیشترین میزان حجم مخصوص و تخلخل) و بهترین نمونه فاز اول در حضور اسانس هل (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) انجام شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار مقایسه میانگین توکی با سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت پذیرفت ($P<0.05$). برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار Mini-Tab17 و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. کلیه آزمایشات بجز ویژگی های حسی با سه تکرار انجام گرفت. برای ویژگی‌های حسی ۳۰ تکرار در نظر گرفته شد (تعداد تکرار در پخت× تعداد ارزیاب‌ها).

نتایج و بحث

رطوبت

جدول ۲ نتایج رطوبت دونات‌های تولیدی را در سه بازه زمانی بلافاصله پس از سرخ کردن و ۳ روز و یک هفته پس از تولید نشان می‌دهد. همانطور که نتایج نشان می‌دهد نمونه حاوی ۸۵ درصد آرد گندم، ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۱ درصد صمغ دانه ریحان به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) از بیشترین میزان رطوبت در هر سه بازه زمانی (۲ ساعت، ۳ روز و یک هفته پس از تولید) در مقایسه با سایر نمونه‌ها برخوردار بودند.

بتاگلوکان موجود در آرد تریتیکاله یکی از عوامل افزایش رطوبت محصولات حاوی این آرد است. زیرا بتاگلوکان به دلیل آرایش انعطاف پذیر، محلول در آب بوده و معمولا محلول‌هایی با گرانروی بالا تشکیل می‌دهد که قابلیت حفظ رطوبت و جذب آب بیشتر را در مقایسه با نمونه فاقد آن دارد (Li et al., 2006). از طرفی همانطور که مشاهده شد، افزایش بیش از ۱۵ درصد آرد تریتیکاله در فرمول دونات سبب کاهش رطوبت نمونه‌های تولیدی شد. علت کاهش میزان رطوبت دونات‌های تولیدی با افزایش سطح جایگزینی آرد گندم با آرد ترتیکاله را چنین می‌توان توجیه نمود که در اثر این جایگزینی

میزان گلوتن کل فرمولاسیون کاهش یافته و همین امر با تضعیف شبکه گلوتنی موجود در خمیر دونات در کاهش و از دست دادن رطوبت طی فرایند سرخ کردن و نگهداری آن مؤثر بوده است. در ارتباط با رطوبت بیشتر دونات‌های حاوی صمغ ریحان نیز باید گفت که صمغ‌ها دارای ماهیت آبدوست هستند و از این طریق سبب حفظ رطوبت خمیر طی فرایند سرخ کردن و نگهداری دونات می‌گردند. Sheikholeslami و همکاران (۲۰۱۸) از صمغ دانه ریحان در فرمولاسیون اشترودل حاصل از خمیر منجمد استفاده کردند و ترکیبات هیدروکلوئیدی را عاملی مؤثر بر حفظ رطوبت طی فرایند پخت و نگهداری دانستند. همچنین Mortazavi و Yousefzadeh Sani (۲۰۱۷) از صمغ ریحان و زانتان در فرمول پوشش ناگت مرغ استفاده نمودند و حضور صمغ را عاملی بر کاهش تردی پوشش ناگت مرغ و کاهش افت رطوبت آن گزارش کردند.

جدول ۲- اثر آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بر رطوبت دونات در سه بازه زمانی ۲ ساعت، ۳ روز و یک هفته پس از تولید

Table 2- Effect of triticale flour and basil seed gum on doughnuts moisture in three time periods of 2 hours, 3 days and one week after production

Treatments تیمارها	Moisture (%) رطوبت (درصد)		
	2 hours ۲ ساعت	3 days ۳روز	1 week یک هفته
Control (100% wheat flour- no triticale flour and gum) شاهد (۱۰۰ درصد آرد گندم- فاقد آرد تریتیکاله و صمغ)	19.33± 0.55^{e}	16.95± 0.51^{ef}	15.41± 0.93^{e}
100% wheat flour+ 0.50% gum ۱۰۰ درصد آرد گندم+ ۰/۵۰ درصد صمغ	22.57± 0.72^{cd}	19.99± 1.43^{cd}	16.27± 0.76^{c}
100% wheat flour+ 1% gum ۱۰۰ درصد آرد گندم+ ۱ درصد صمغ	23.97± 0.32^{bc}	22.85± 0.17^{b}	20.89± 1.03^{b}
85% wheat flour+ 15% triticale flour ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله	21.83± 0.15^{d}	19.11± 1.09^{de}	15.68± 1.09^{c}
70% wheat flour+ 30% triticale flour ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله	18.96± 0.72^{e}	15.06± 1.13^{f}	11.25± 0.91^{d}
85% wheat flour+ 15% triticale flour+ 0.50 gum ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ صمغ	25.10± 0.75	24.63± 0.29^{ab}	21.01± 1.02^{b}
85% wheat flour+ 15% triticale flour+ 1% gum ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۱ درصد صمغ	26.90± 0.61^{a}	26.12± 1.13^{a}	24.12± 1.12^{a}
70% wheat flour+ 30% triticale flour+ 0.50 gum ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله+۰/۵۰ صمغ	22.46± 0.24^{cd}	19.25± 1.12^{de}	16.52± 0.76^{c}
70% wheat flour+ 30% triticale flour+ 1% gum ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله+ ۱ درصد صمغ	23.81± 0.83^{bc}	22.13± 1.04^{bc}	17.89± 1.19^{c}

حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح P<0.05 تفاوت معنی‌داری ندارند.

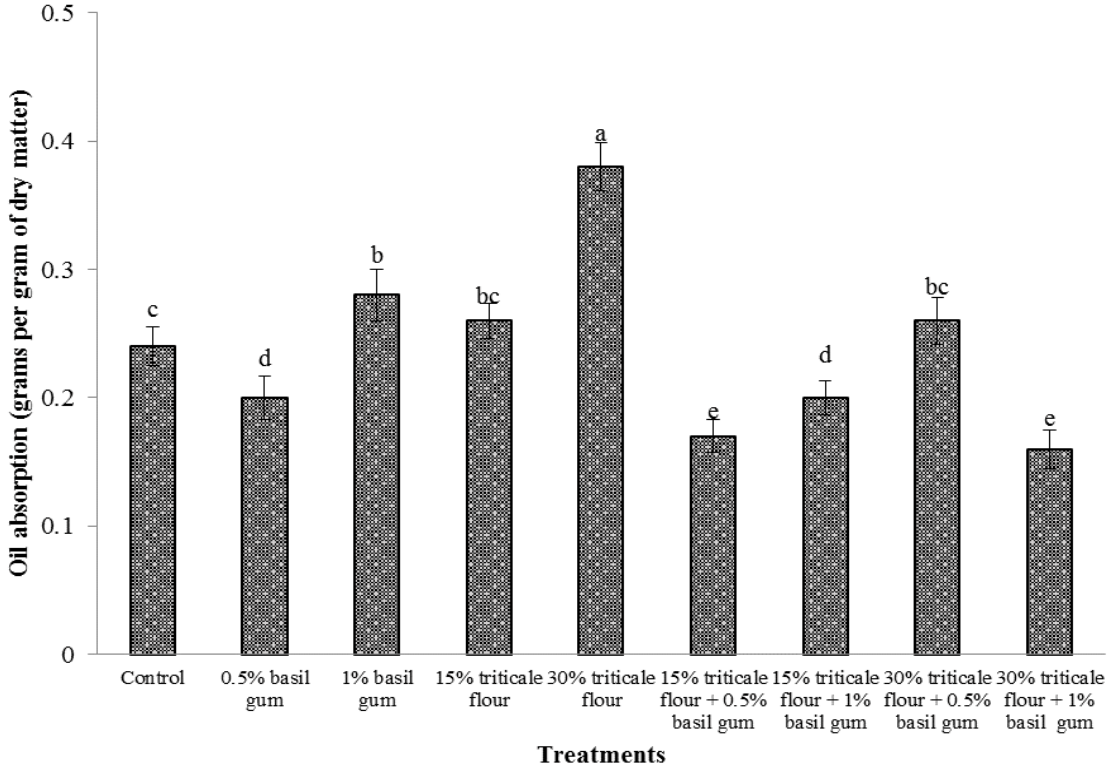
Similar letters in each column are not statistically significant at the level of P <0.05.

محتوی روغن

شکل ۲ نشان‌دهنده میزان محتوی روغن دونات‌های تولیدی است. نتایج حاکی از آن بود که نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد تریتیکاله و ۱ درصد صمغ دانه ریحان از کمترین محتوی روغن در مقایسه با سایر نمونه‌ها برخوردار بودند. لازم به ذکر است که این انتظار وجود داشت که نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم و ۱ درصد صمغ دانه ریحان (فاقد آرد تریتیکاله) از کمترین محتوی روغن در مقایسه با سایر نمونه‌ها برخوردار باشد، اما چنین نتیجه‌ای مشاهده نشد که به احتمال زیاد این امر تحت تأثیر رقابت نشاسته و صمغ در جذب آب بوده است و از آنجا که ۱ درصد صمغ در نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم زیاد بوده و صرف اصلاح ساختار مصول هدف نشده است، آب را از دسترس نشاسته جهت ژلاتیناسیون طی فرایند سرخ کردن، خارج نموده و چون بافت دونات به خوبی ژلاتینه نشده است، روغن بیشتری را در مقایسه با نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۳۰ درصد آرد تریتیکاله در همین سطح مصرفی روغن (۱ درصد) جذب نموده است.

طبق یافته‌های Sakhale و همکاران (۲۰۱۱) نیز هرچه افت رطوبت ماده غذایی حین فرایند سرخ کردن بیشتر باشد، محتوی روغن بیشتر می‌شود (Sakhale et al., 2011). Salvador و همکاران (۲۰۰۸) به مطالعه اثر صمغ متیل سلولز به‌عنوان پوشش در فراورده‌های خمیری سرخ شده نظیر دونات پرداختند. نتایج این پژوهشگران نشان داد، صمغ متیل سلولز به‌طور مؤثری محتوی روغن

بسیاری از فراورده‌های دارای پوشش خمیری را کاهش داد. بنابراین قابل پیش‌بینی بود در نمونه های حاوی صمغ در مقایسه با نمونه‌های فاقد آن به دلیل افزایش رطوبت فراورده و کاهش افت رطوبت طی فرایند سرخ کردن، محتوی روغن نیز کاهش یابد و به‌طور کل نمونه‌هایی با رطوبت بیشتر از محتوی روغن کمتری برخوردار باشند (Salvador et al., 2008). Quasem و همکاران (۲۰۰۹) خمیر نشاسته پوشش‌دار و بدون پوشش را از نظر دفع رطوبت و محتوی روغن مقایسه کردند. نتایج این محققان نشان داد محتوی روغن محصول پوشش‌دار شده با متیل سلولز، ۸۰ درصد کاهش یافت (Quasem et al., 2009). Zolfaghari و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر نوع پوشش هیدروکلوئیدی و افزودن آرد سویا بر ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی دونات را بررسی کردند. نتایج این محققان نشان داد جایگزینی آرد سویا با آرد گندم تأثیر معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد بر میزان رطوبت و روغن نداشت. همچنین نتایج نشان داد تأثیر استفاده از پوشش هیدروکلوئیدی بر میزان رطوبت معنی‌دار نبود ولی سبب کاهش محتوی روغن شد (Zolfaghari et al., 2013). Kim و همکاران (۲۰۱۵) اثرات صمغ هیدروکسی‌پروپیل‌متیل‌سلولز بر محتوی روغن و بافت دونات سویا فاقد گلوتن را بررسی کردند. نتایج نشان داد که دونات حاوی سویا در حدود دو برابر محتوی روغن و افت رطوبت بیشتر در مقایسه با نمونه شاهد داشتند. همچنین نتایج نشان داد که افزودن صمغ به فرمولاسیون دونات سبب افزایش جذب آب و کاهش محتوی روغن نمونه‌های تولیدی شد (Kim et al., 2015). Saguy و Pinthus (۱۹۹۵) نیز بیان کردند که اولین مکانیسم جذب روغن جایگزینی آب است. در این حالت روغن به ماده غذایی چسبیده و متناسب با مقدار آبی که ماده غذایی از دست داده، وارد منافذ موجود در ماده غذایی می‌شود. این عمل از چروکیده شدن سطح ماده غذایی جلوگیری می‌کند (Saguy and Pinthus, 1995). Sabbaghi و Ziaiifar (۲۰۱۸) بیان کردند که با افزایش غلظت بقایای روغن در بستر سرخ‌کن، جذب روغن نیز بیشتر خواهد شد. ترکیبات هیدروکلوئیدی با کاهش خروج رطوبت موجب جلوگیری از واکنش‌های هیدرولیز می‌گردند و در نتیجه ساختار روغن کمتر دچار آلودگی پلیمری خواهد شد (Ziaiifar and Sabbaghi, 2018).



شکل ۲- اثر آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بر محتوی روغن دونات‌های تولیدی

حروف مشابه از نظر آماری در سطح **P<0.05** تفاوت معنی‌داری ندارند

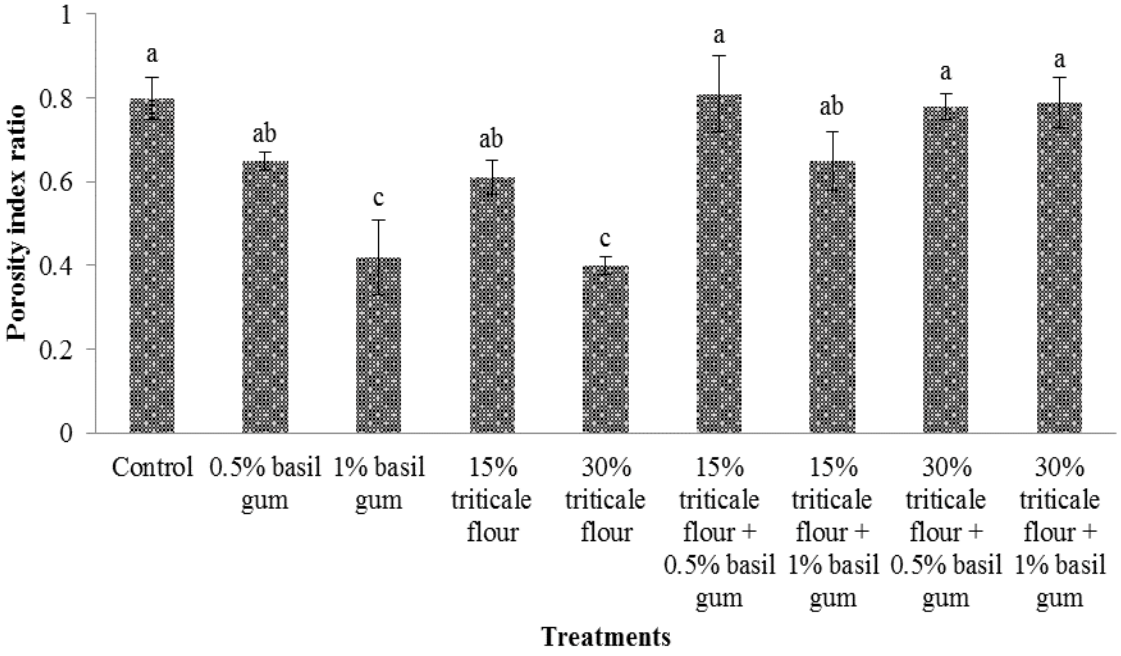
Fig. 2. Effect of triticale flour and basil seed gum on the oil content of doughnuts

Similar letters are not statistically significant at the level of P <0.0

تخلخل

شکل ۳ نشان‌دهنده تخلخل نمونه دونات‌های تولیدی است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد نمونه شاهد، نمونه حاوی ۱۵ درصد

آرد تریتیکاله به همراه ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد تریتیکاله در هر دو سطح مصرفی صمغ دانه ریحان (۰/۵۰ و ۱ درصد) دارای بیشترین میزان تخلخل بودند و بین این ۴ نمونه اختلاف معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده نشد. تخلخل به ساختار منافذ بافت درونی فراورده‌های نانوایی اشاره دارد و یکی از عوامل تأثیرگذار در خواص کیفی بافت درونی این دسته از محصولات محسوب می‌شود. از طرفی میزان تخلخل بافت درونی تحت تأثیر تعداد حفرات موجود در مغز بافت و هم‌چنین نحوه توزیع و پخش این حفرات است که هرچه تعداد حفرات و سلول‌های گازی بیشتر باشد و توزیع و پخش آن‌ها یکنواخت‌تر صورت گرفته باشد، میزان تخلخل فراورده نهایی بیشتر خواهد بود (Sahraiyan, 2016).



شکل ۳- اثر آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بر تخلخل دونات‌های تولیدی

حروف مشابه از نظر آماری در سطح P<0.05 تفاوت معنی‌داری ندارند

Fig. 3. The effect of triticale flour and basil seed gum on the porosity of doughnuts

Similar letters are not statistically significant at the level of P <0.05

در نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۳۰ درصد آرد تریتیکاله (نمونه‌های فاقد صمغ) حباب‌های بزرگ هوا مشاهده گردید. به احتمال زیاد علت این امر آنست که از یک طرف آرد تریتیکاله دارای عوامل احیاکننده و پروتئازهای بیشتری نسبت به آرد گندم است (Pourmohammadi et al., 2011) که موجب کاهش پایداری خمیر، تضعیف ساختار محصول هدف و اختلال در ویژگی‌های تکنولوژیکی محصولات نانوایی از جمله بافت، حجم و تخلخل می‌شود (Fars et al., 2016). از طرف دیگر شبکه گلوتنی موجود در خمیر به دلیل حضور آرد ترتیکاله که یک آرد ضعیف است، ساختار ضعیف شده و قابلیت نگهداری حباب‌های هوا و استحکام بخشیدن به دیواره این حباب‌ها جهت حفظ آن‌ها در برابر پاره شدن ناشی از انبساط حین فرایند سرخ کردن مهیا نگردید و چندین حباب هوا در اثر پاره شدن به یکدیگر ملحق شده‌اند و پدیده تونلینگ اتفاق افتاده است که منجر به کاهش تخلخل می‌شود. Makinen و Arendt (۲۰۱۲) در پژوهش خود به این نکته اشاره نمودند که در محصولات تخمیری حاوی آرد ضعیف با ایجاد حالت چسبندگی و اندک ضخیم شدن سلول‌های گازی موجود در خمیر و بالطبع محصول نهایی می‌توان از پاره شدن این حفرات به طوری که دو یا چند حفره کوچک به یک حفره بزرگ تبدیل شود، جلوگیری به عمل آورد و در حفظ تعداد بیشتری سلول‌های گازی و حتی پخش یکنواخت‌تر آن‌ها موفق عمل نمود. Khorsand و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی اثر جایگزینی آرد سویا و عدس بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی دونات تخمیری پرداختند. در این پژوهش مقدار صفر، ۱۵ و ۳۰ درصد آرد سویا و آرد عدس جایگزین آرد گندم در نمونه‌های دونات شد. نتایج نشان داد جایگزینی آرد عدس و سویا موجب کاهش حجم و تخلخل به دلیل

تضعیف شبکه گلوتنی و کاهش توانایی نگهداری گازهای ناشی از تخمیر شد (Khorsand et al., 2018).

در پژوهش حاضر اثر مثبت صمغ دانه ریحان در استحکام بخشیدن به شبکه گلوتنی و بهبود آن بخصوص در نمونه‌های حاوی آرد تریتیکاله مشاهده شد. لازم به ذکر است با افزایش سطح جایگزینی آرد گندم با آرد تریتیکاله، نیاز به مصرف سطح بیشتر صمغ دانه ریحان در فرمولاسیون دونات افزایش یافت. به‌طوری که در سطح جایگزینی ۱۵ درصد آرد گندم با آرد تریتیکاله استفاده از ۰/۵ درصد صمغ دانه ریحان توصیه می‌شود و استفاده بیش از ۰/۵ درصد صمغ در فرمولاسیون منجر به کاهش تخلخل نمونه می‌شود. این امر را چنین می‌توان تفسیر نمود که با افزایش غلظت صمغ ریحان در نمونه‌های حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و با توجه به ثابت بودن میزان آب فرمولاسیون، بین گلوتن و صمغ ریحان در جذب آب رقابت ایجاد می‌شود و با افزایش غلظت صمغ، آب کافی جهت توسعه شبکه گلوتنی وجود نخواهد داشت لذا شبکه گلوتنی ضعیف شده و قدرت نگهداری گاز و همچنین توزیع یکنواخت آن در حین تخمیر کاهش می‌یابد و در نتیجه آن کاهش تخلخل نمونه‌های تولیدی مشاهده خواهد شد. Ghorbani و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر صمغ ریحان و کتیرا بر بهبود کیفیت و ماندگاری دونات روغنی پرداختند. نتایج این پژوهشگران حاکی از افزایش تخلخل نمونه‌های حاوی صمغ به دلیل ایجاد خمیری منسجم و یکدست و بالطبع اثر مثبت آن بر پخش بهتر حباب‌های هوای موجود در خمیر و از سوی دیگر حفظ تعداد بیشتری از حباب‌های هوای طی فرایند سرخ کردن (بخش اعظم حباب های هوا طی فرایند تخمیر تولید شده) بود (Ghorbani et al., 2018). Sahraiyan و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود اثر صمغ شاهی و گوار را در نان حاوی آرد گندم- برنج مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش بیانگر آن بود که نمونه حاوی ۰/۳ درصد صمغ گوار و ۰/۳ درصد صمغ شاهی و نمونه حاوی ۰/۳ درصد صمغ گوار و ۰/۶ درصد صمغ شاهی دارای بیشترین دارای بالاترین حجم مخصوص و تخلخل بودند (Sahraiyan et al., 2013).

حجم مخصوص

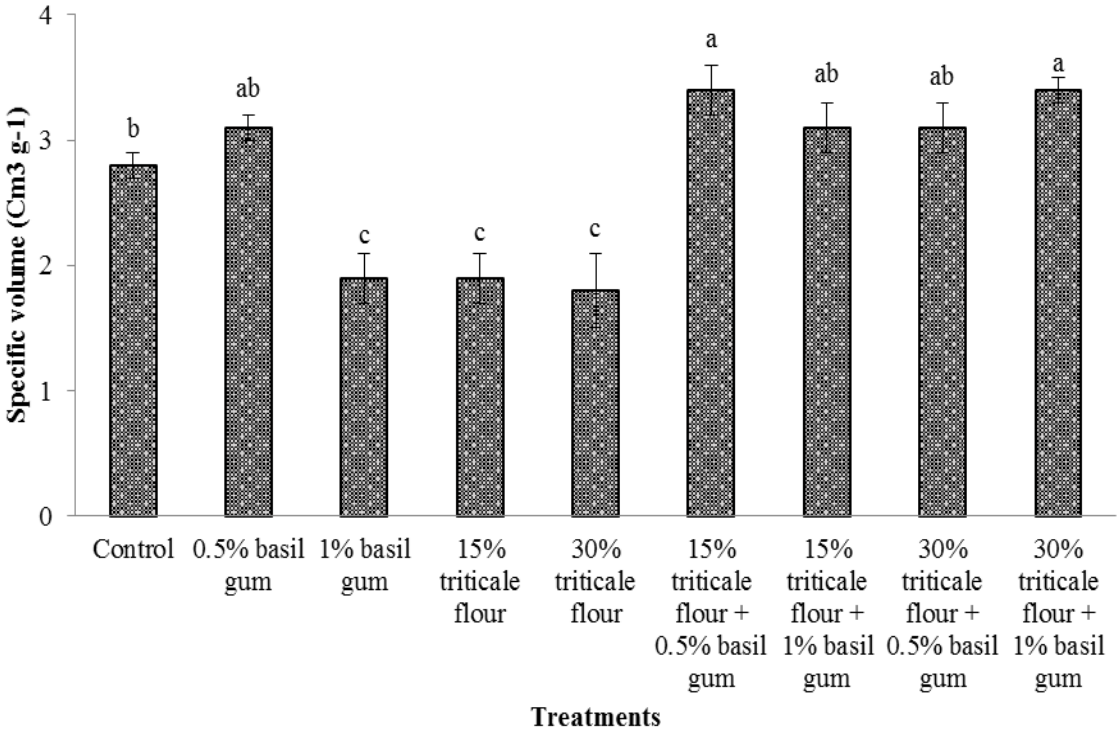
شکل ۴ نشان‌دهنده حجم مخصوص نمونه دونات‌های تولیدی است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد تریتیکاله و ۱ درصد صمغ دانه ریحان به طور معنی‌داری ($P<0.05$) از بیشترین میزان حجم مخصوص در مقایسه با سایر نمونه‌ها برخوردار بودند.

حضور آرد تریتیکاله به‌خصوص سطح ۱۵ درصد در افزایش حجم مخصوص مؤثر بود. این در حالی است که اثر مثبت صمغ دانه ریحان وابسته به سطح جایگزینی آرد گندم با آرد تریتیکاله بود. بدین صورت که نمونه حاوی ۱۵ و ۳۰ درصد آرد ترتیکاله جهت داشتن بیشترین حجم مخصوص به‌ترتیب به ۰/۵۰ و ۱ درصد صمغ احتیاج داشتند. این در حالی است که میزان حجم مخصوص نمونه‌های حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم در هر سه سطح مصرفی صمغ دانه ریحان کمتر از دو نمونه ذکر شده بود. در میان نمونه‌های حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم بیشترین میزان حجم مخصوص در نمونه حاوی ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان مشاهده شد.

حجم یکی از ویژگی‌های مهم کیفی فراورده‌های نانوایی است که نشان‌دهنده ظرفیت خمیر برای نگهداری حباب‌های گاز و انعطاف پذیری آن است. Saldivar و همکاران (۲۰۱۴) آرد تریتیکاله را با آرد یک رقم گندم اسپانیایی مخلوط کردند و بالاترین حجم نان و بهترین خصوصیات فراورده هدف را با اختلاط نسبت ۲۰ به ۸۰ آرد تریتیکاله و گندم مشاهده نمودند. این محققان به این نتیجه رسیدند که اثر بهبوددهندگی آرد تریتیکاله ناشی از فعالیت آلفاآمیلازی بالای آن است که فعالیت پایین آلفاآمیلازی در آرد گندم را جبران می‌کند (Saldivar et al., 2014). Fras و همکاران (۲۰۱۶) و Pourmohammadi و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند آرد تریتیکاله استانداردهای تکنولوژیکی همانند گندم را دارا نیست و از طرفی چون دارای عوامل احیاکننده و پروتئازهای بیشتری نسبت به آرد گندم است، در صورت استفاده از سطوح بالای این آرد در محصولات نانوایی، ساختار بیش از حد تضعیف شده و توانایی حفظ و نگهداری حباب‌های هوا در بافت محصول کاهش می‌یابد که همین امر سبب کاهش حجم و تخلخل می‌شود (Fras et al., 2016; Pourmohammadi et al., 2011). Hejrani و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی اثر صمغ ریحان و بالنگوشیرازی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نان بربری نیم‌پز منجمد پرداختند. در این پژوهش سطوح متفاوت صمغ بالنگوشیرازی و ریحان (صفر، ۰/۳ و ۰/۵ درصد) با ۰/۴ درصد صمغ گوار مقایسه گردید. نتایج این محققان نشان داد استفاده از صمغ‌های گیاهی ریحان و بالنگوشیرازی در مقایسه با صمغ گوار در افزایش حجم و تخلخل مؤثر بود. این محققان علت را افزایش ضخامت حباب‌های هوای تولید شده دانستند. به‌طوری که صمغ با افزایش ضخامت سلول‌های گازی مانع از پاره شدن آن‌ها طی فرایند تولید شد و انبساط این سلول‌ها طی فرایند تولید در افزایش حجم مؤثر بود (Hejrani et al., 2017). Ghorbani و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر صمغ ریحان و کتیرا بر بهبود کیفیت و ماندگاری دونات روغنی پرداختند. نتایج این پژوهشگران

حاکی از افزایش حجم مخصوص در نمونه‌های حاوی صمغ بود (Ghorbani et al., 2018). Fazeli و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی اثر صمغ‌های زانتان و گوار بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی دونات فاقد گلوتن پرداختند. این محققان گزارش کردند، هیدروکلوئیدها با ایجاد حالت ویسکوالاستیک و اعمال ویژگی‌های بین سطحی باعث افزایش تخلخل و حجم مخصوص دونات‌ها شدند (Fazeli et al., 2019). Salehi و همکاران (۲۰۱۷) نیز با بررسی اثر صمغ دانه ریحان بر ویژگی‌های خمیر و کیک برنجی نتایج مشابهی مبنی بر افزایش حجم در نتیجه افزودن صمغ دانه ریحان به فرمول محصول هدف گزارش کردند (Salehi et al., 2017).

نکته قابل توجهی که در این پژوهش مشاهده شد آن بود که عملکرد مثبت صمغ دانه ریحان در سطح ۱ درصد (به‌جز در نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد تریتیکاله) کمتر از سطح ۰/۵ درصد بود و حتی در نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم و نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله سبب کاهش حجم مخصوص دونات شد. علت این امر را چنین می‌توان تفسیر نمود که با افزایش غلظت صمغ ریحان و با توجه به ثابت بودن میزان آب فرمولاسیون، بین گلوتن و صمغ ریحان در جذب آب رقابت ایجاد می‌شود و با افزایش غلظت صمغ، آب کافی جهت توسعه شبکه گلوتنی وجود نخواهد داشت لذا شبکه گلوتنی ضعیف شده و قدرت نگهداری گاز و همچنین میزان توسعه آن در حین تخمیر و سرخ کردن کاهش می‌یابد و در نتیجه آن کاهش حجم مخصوص نمونه‌های تولیدی مشاهده خواهد شد. همچنین صمغ اضافی با جذب بیش از حد آب و ممانعت از تبخیر بخشی از آب طی فرایند سرخ کردن، مانع از افزایش حجم وابسته به تبخیر شده و حجم مخصوص دونات را کاهش داده است. از طرفی تبخیر شدید آب، طی انتقال حرارت در فرآیند سرخ‌کردن، موجب ایجاد حفرات و منافذ غیرعادی در ماده غذایی می‌شود و ترکیبات هیدروکلوئیدی با کاهش ضریب انتقال حرارت و قابلیت نگهداری آب، شدت تبخیر آب را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تبخیر شدید همچنین موجب چروکیدگی محصول و توسعه تخلخل و زبری سطحی می‌گردد (افزایش جذب روغن). تبخیر خیلی شدید می‌تواند منجر به تشکیل حفرات بزرگ‌تری نیز در سطح محصول گردد.



شکل ٤- اثر آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بر حجم مخصوص دونات‌های تولیدی

حروف مشابه از نظر آماری در سطح P<0.05 تفاوت معنی‌داری ندارند

Fig. 4. Effect of triticale flour and basil seed gum on the specific volume of produced doughnuts

Similar letters are not statistically significant at the level of P <0.05

بافت

جدول ۳ نتایج سفتی بافت دونات‌های تولیدی را در سه بازه زمانی بلافاصله پس از سرخ کردن و ۳ روز و یک هفته پس از تولید

نشان می‌دهد. نتایج به وضوح نشان داد نمونه شاهد (نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم- فاقد صمغ دانه ریحان)، نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله در هر دو سطح مصرفی صمغ دانه ریحان (۰/۵۰ و ۱ درصد) و نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد تریتیکاله و ۱ درصد صمغ دانه ریحان از کمترین سفتی بافت در بازه زمانی ۲ ساعت پس از سرخ کردن برخوردار بودند. این در حالی بود که نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم در حضور ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۱ درصد صمغ دانه ریحان طی یک هفته کمترین سفتی بافت را داشتند. به‌طور کل صمغ دانه ریحان در حفظ نرمی بافت طی یک هفته انبارمانی مشهود بود، زیرا تمام نمونه‌های حاوی صمغ نسبت به نمونه شاهد نرمتر بودند. لازم به ذکر است افزایش بیش از ۱۵ درصد آرد تریتیکاله در غیاب صمغ دانه ریحان سبب افزایش سفتی بافت دونات شد. بدین صورت که بافت نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد تریتیکاله (فاقد صمغ) طی یک هفته ماندگاری دارای سفت‌ترین بافت در مقایسه با سایر نمونه‌ها بود. نکته قابل توجه آنست که بافت دونات حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله (فاقد صمغ دانه ریحان) نرمتر از بافت نمونه شاهد (حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم- فاقد صمغ دانه ریحان) بود.

جدول ۳- اثر آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بر سفتی بافت دونات در سه بازه زمانی ۲ ساعت، ۳ روز و یک هفته پس از تولید

Table 3- The effect of triticale flour and basil seed gum on the firmness of doughnuts texturein three time periods of 2 hours, 3 days and one week after production

Treatments تیمارها	doughnuts texture firmness (Newton) سفتی بافت دونات (نیوتن)		
	2 hours ۲ ساعت	3 days ۳روز	1 week یک هفته
Control (100% wheat flour- no triticale flour and gum) شاهد (۱۰۰ درصد آرد گندم- فاقد آرد تریتیکاله و صمغ)	7.22 ±0.71^{c}	10.83 ±1.26^{bc}	19.58 ±0.85^{b}
100% wheat flour+ 0.50% gum ۱۰۰ درصد آرد گندم+ ۰/۵۰ درصد صمغ	8.91 ±0.79^{bc}	10.67 ±1.04bc	12.23 ±1.12^{d}
100% wheat flour+ 1% gum ۱۰۰ درصد آرد گندم+ ۱ درصد صمغ	11.13 ±0.79^{b}	12.71 ±1.25^{b}	14.41 ±0.92^{cd}
85% wheat flour+ 15% triticale flour ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله	9.04 ±0.81^{a}	17.34 ±1.12^{a}	22.59 ±1.17^{a}
70% wheat flour+ 30% triticale flour ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله	15.63 ±1.65^{a}	19.83 ±1.36^{a}	11.91 ±1.02^{d}
85% wheat flour+ 15% triticale flour+ 0.50 gum ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ صمغ	6.78 ±0.39^{c}	8.36 ±1.18^{c}	17.28 ±1.05^{bc}
85% wheat flour+ 15% triticale flour+ 1% gum ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۱ درصد صمغ	7.19 ±0.61^{c}	10.33 ±0.57^{bc}	25.09 ±1.13^{a}
70% wheat flour+ 30% triticale flour+ 0.50 % gum ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ صمغ	11.40 ±0.94^{b}	13.08 ±1.12^{b}	19.18 ±0.98^{b}
70% wheat flour+ 30% triticale flour+ 1% gum ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله+ ۱ درصد صمغ	7.17 ±0.77^{c}	12.48 ±1.09^{b}	15.43 ±0.68^{c}

حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح P<0.05 تفاوت معنی‌داری ندارند.

Similar letters in each column are not statistically significant at the level of P <0.05.

Saldivar و همکاران (۲۰۱۴) با جایگزینی آرد گندم با تریتیکاله در محصولات نانوایی گزارش کردند اثر بهبوددهندگی آرد تریتیکاله ناشی از فعالیت آلفاآمیلازی بالای این آرد نسبت به آرد گندم است که فعالیت پایین آلفاآمیلازی در آرد گندم را جبران می‌کند و اثر ضدبیاتی دارد (Saldivar et al., 2014). از طرفی Pourmohammadi و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند آرد تریتیکاله استانداردهای تکنولوژیکی همانند گندم را دارا نیست و از طرفی چون دارای عوامل احیاکننده و پروتئازهای بیشتری نسبت به آرد گندم است، در صورت استفاده از سطوح بالای این آرد در محصولات نانوایی، ساختار بیش از حد تضعیف شده که همین امر بر بافت محصول هدف اثر مخرب دارد (Pourmohammadi et al., 2011). Rajabi و Sheikholeslami و (۲۰۱۴) با بررسی اثر آرد تریتیکاله و صمغ کتیرا بر خواص کیفی و رئولوژی نان قالبی ترکیبی (گندم- تریتیکاله) نتایج مشابهی را مبنی بر تخریب بافت نان قالبی در سطوح بالای مصرف آرد تریتیکاله گزارش نمودند (Rajabi and Sheikholeslami, 2014). نمونه‌هایی که از رطوبت بیشتر در مدت زمانی نگهداری برخوردارند، دارای بافت

نرم‌تری می‌باشند. زیرا این نمونه‌ها به دلیل ترکیبات جاذب الرطوبه‌ای که در میان فرمولاسیون اولیه خود دارند نظیر صمغ دانه ریحان از مهاجرت سریع رطوبت از بافت درونی به پوسته جلوگیری می‌کنند و به عبارتی خروج رطوبت و از دست دادن آب که عامل اصلی بیاتی و سفت شدن بافت درونی محصولات نانوایی طی انبارمانی است، بسیار کند صورت گیرد. Siricho NworraNit و همکاران (۲۰۱۶) با جایگزینی آرد گندم با آرد برنج سیاه در دونات گزارش کردند با افزایش مقادیر آرد برنج سیاه، خاکستر، رطوبت و محتوی فیبر افزایش در حالی که چربی و مقادیر پروتئین کاهش یافت. همچنین با افزایش درصد آرد برنج سیاه سفتی و قابلیت جویدن دونات‌ها افزایش و پیوستگی و فنریت و حجم مخصوص کاهش یافت که در حضور صمغ در فرمول محصول نهایی به دلیل تقویت شبکه گلوتنی و کنترل خروج رطوبت طی فرایند سرخ کردن، بافت و نرمی آن بهبود یافت. Fazeli و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی اثر صمغ‌های زانتان و گوار بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی دونات فاقد گلوتن پرداختند (Fazeli et al., 2019). این محققان گزارش کردند، هیدروکلوئیدها با ایجاد حالت ویسکوالاستیک و اعمال ویژگی‌های بین سطحی باعث بهبود بافت دونات و افزایش نرمی آن در مقایسه با نمونه‌های فاقد صمغ شدند. Salehi و همکاران (۲۰۱۷) نیز با بررسی اثر صمغ دانه ریحان بر ویژگی‌های خمیر و کیک برنجی نتایج مشابهی مبنی بر کاهش سفتی بافت در نتیجه افزودن صمغ دانه ریحان به فرمول محصول هدف گزارش کردند. این محققان حضور صمغ دانه ریحان در فرمول محصول هدف را عاملی بر حفظ رطوبت طی مدت زمان ماندگاری و کاهش سرعت فرایند بیاتی دانستند (Salehi et al., 2017).

رنگ پوسته

جدول ۴ نشان‌دهنده شاخص‌های رنگی پوسته دونات است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد نمونه حاوی ۸۵ درصد آرد گندم، ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵ درصد صمغ دانه ریحان از بیشترین میزان L^* در مقایسه با سایر نمونه‌ها برخوردار بود ($P<0.05$).

جدول ٤- اثر آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بر مؤلفه‌های رنگی پوسته دونات (L^*a^*b)

Table 4- The effect of triticale flour and basil seed gum on the color components of doughnuts crust (L * a * b)

مؤلفه‌های رنگی پوسته دونات Doughnuts crust color components			تیمارها Treatments
b^*	a^*	L^*	
21.89±3.01[a]	12.38±1.03[cd]	50.81±1.75[b]	Control (100% wheat flour- no triticale flour and gum) شاهد (۱۰۰ درصد آرد گندم- فاقد آرد تریتیکاله و صمغ)
21.64±0.58[a]	8.22±0.52[c]	51.24±0.67[ab]	100% wheat flour+ 0.50% gum ۱۰۰ درصد آرد گندم+ ۰/۵۰ درصد صمغ
21.77±0.90[a]	6.06±0.96[c]	50.75±0.99[b]	100% wheat flour+ 1% gum ۱۰۰ درصد آرد گندم+ ۱ درصد صمغ
21.29±1.74[a]	16.03±1.03[b]	54.34±1.29[ab]	85% wheat flour+ 15% triticale flour ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله
21.41±1.12[a]	19.33±0.45[a]	44.92±1.16[c]	70% wheat flour+ 30% triticale flour ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله
21.68±1.99[c]	13.19±0.19[c]	55.27±1.77[a]	85% wheat flour+ 15% triticale flour+ 0.50 gum ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ صمغ
20.97±2.08[a]	10.87±0.56[d]	53.98±1.09[ab]	85% wheat flour+ 15% triticale flour+ 1% gum ۸۵ درصد آرد گندم+ ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۱ درصد صمغ
21.09±1.71[a]	13.11±0.45[c]	46.03±0.87[c]	70% wheat flour+ 30% triticale flour+ 0.50 gum ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ صمغ
20.53±1.01[a]	11.08±1.19[cd]	45.59±2.61[c]	70% wheat flour+ 30% triticale flour+ 1% gum ۷۰ درصد آرد گندم+ ۳۰ درصد آرد تریتیکاله+ ۱ درصد صمغ

حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح $P<0.05$ تفاوت معنی‌داری ندارند.

Similar letters in each column are not statistically significant at the level of $P<0.05$.

همچنین نتایج نشان می‌دهد در صورت استفاده از ۱۰۰ آرد گندم و مخلوط ۸۵ درصد آرد گندم و ۱۵ درصد آرد تریتیکاله به حداکثر ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و در صورت استفاده از ۷۰ درصد آرد گندم و ۳۰ درصد آرد تریتیکاله به میزان ۱ درصد صمغ دانه ریحان جهت حصول بهترین نتیجه مؤلفه رنگی a^* نیاز بود. حضور ۱ درصد صمغ دانه ریحان در فرمول دونات سبب کاهش مؤلفه رنگی a^* شد.

تنها نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد تریتیکاله و ۱ درصد صمغ دانه ریحان اثر منفی بر قرمزی رنگ پوسته دونات نداشت. لازم به ذکر است با وجود کاهش مؤلفه رنگی b^* در نتیجه افزایش سطح مصرفی آرد تریتیکاله در فرمول دونات، این کاهش در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار نبود که علنا حضور آرد تریتیکاله و صمغ دانه ریحان بر زردی رنگ پوسته دونات اثر نداشت.

از آنجا که در دونات منبع کربوهیدرات در دسترس است، حضور آنزیم آلفاآمیلاز در آرد تریتیکاله می‌تواند، بر رنگ پوسته اثر بگذارد که این تأثیر در نتیجه تولید دکسترین توسط این آنزیم و افزایش شدت واکنش مایلارد که اصلی‌ترین عامل در ایجاد رنگ پوسته است، می‌باشد (Rajabi & Sheikholeslami, 2014). اما افزایش بیش از حد این آنزیم در فرمولاسیون با تولید بیش از اندازه دکسترین ضمن ایجاد تیرگی باعث ایجاد چسبندگی و در نتیجه چروکیدگی سطح می شود که این امر در کاهش انعکاس نور و مؤلفه رنگی L^* مؤثر است. اثر آنزیم آمیلاز بر رنگ پوسته را می‌توان به علت اثر این آنزیم بر تجزیه نشاسته به دکسترین با وزن مولکولی کمتر و شرکت نمودن آن ها در واکنش مایلارد نسبت داد (Kim et al, 2006). Matuda و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند، افزودن آنزیم آمیلاز باعث افزایش رنگ پوسته محصولات نانوایی می‌شود که دلیل آن به خاطر افزایش تشکیل قندهای ساده، همچنین اثر آن بر تجزیه پروتئین‌ها و تولید گروه‌های NH_2 دانستند که مواد در واکنش مایلارد شرکت می‌کنند و سبب تیره شدن رنگ این دسته از محصولات می‌شوند (Matuda et al., 2008). Purlis و Salvadori (۲۰۰۹) براساس یافته‌های پژوهش خود بیان نمودند که تغییرات سطح پوسته، مسئول روشنایی آن است و سطوح منظم و صاف نسبت به سطوح چین‌دار توانایی بیشتری در بهبود رنگ سطح محصول دارد (Purlis and Salvadori, 2009). بنابراین نمونه‌هایی که در آن‌ها تعادل بین سطح مصرفی صمغ دانه ریحان و آرد تریتیکاله برقرار است مانند نمونه حاوی ۸۵ درصد آرد گندم، ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵ درصد صمغ دانه ریحان به دلیل سطح هموارتر در انعکاس نور و ایجاد درخشندگی سطحی موفق‌تر بوده است. در نمونه ذکر شده چند عامل منجر به بهبود خصوصیات سطحی و از طرفی افزایش مؤلفه L^* آن شده است. حضور صمغ دانه ریحان و در تعادل بودن میزان آن با سطح مصرفی آرد ترتیکاله ضمن حفظ رطوبت، ویژگی‌های بافتی نظیر تخلخل و میزان سفتی بافت را بهبود بخشیده از این رو با ایجاد ساختار مناسب و کاهش فشردگی بافت در ایجاد سطوح منظم و صاف در بهبود مؤلفه L^* نقش داشته است.

همچنین نتایج این بخش حاکی کاهش قرمزی دونات در نتیجه افزودن سطوح بالای صمغ به فرمول دونات (به‌جز نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد تریتیکاله) بود. کاهش قرمزی پوسته دونات‌های حاوی سطوح بالای صمغ دانه ریحان را چنین می‌توان تفسیر نمود که افزایش حضور صمغ در فرمولاسیون دونات با افزایش حفظ رطوبت خمیر طی فرایند سرخ کردن جذب روغن را کاهش می‌دهد که این امر با توجه به ثابت بودن مدت زمان و دمای سرخ کردن مانع از تکمیل شدن فرایند سرخ کردن به دلیل رطوبت بالای خمیر شد (Rezaei, 2017). Fazeli و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند تغییر فرمولاسیون دونات از طریق کاهش جذب روغن و افزایش رطوبت خمیر منجر به کاهش رنگ نمونه تولیدی شد (Fazeli et al., 2019).

انتخاب بهترین نمونه

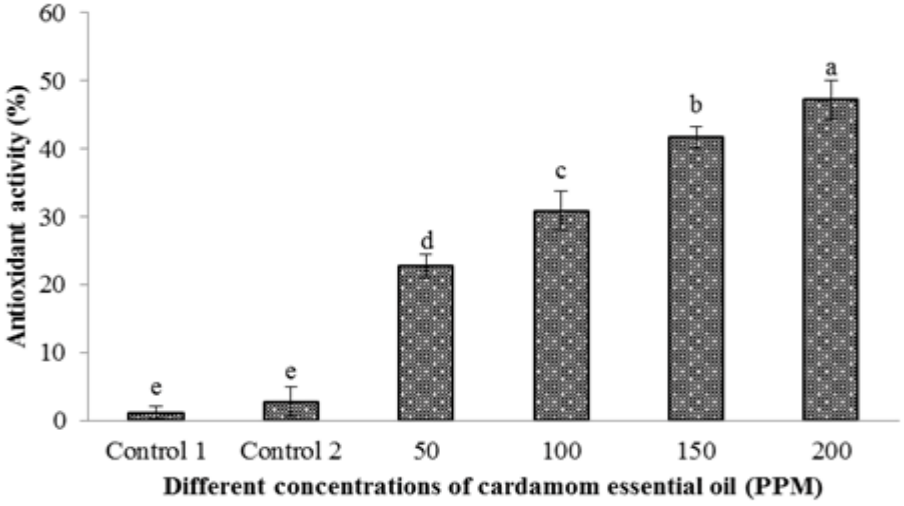
با توجه به نتایج به‌دست آمده از فاز اول، نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان به دلیل ساختار مطلوب (نظیر بیشترین حجم و تخلخل و کمترین سفتی بافت) و کمترین محتوی روغن به‌عنوان بهترین نمونه انتخاب شد. در فاز دوم فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تغییرات کپک و مخمر و ویژگی‌های حسی بهترین نمونه (نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان) تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت اسانس هل سبز (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) بررسی شد. لازم به ذکر است در فاز دوم، دو نمونه به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شدند. بدین صورت که نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم (فاقد آرد تریتیکاله، صمغ دانه ریحان و اسانس هل سبز) به‌عنوان شاهد یک و بهترین نمونه فاز اول به‌عنوان شاهد دو لحاظ شد. علت این امر (در نظر گرفتن دو شاهد برای فاز دو)، بررسی اثر آرد تریتیکاله بر ویژگی‌های حسی و ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی این آرد در فرمول دونات در مقایسه با آرد گندم بود.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

شکل ۵ نشان‌دهنده اثر غلظت‌های متفاوت اسانس هل سبز (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) بر درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در نمونه دونات‌های تولیدی بود. نتایج به وضوح نشان داد، اسانس هل سبز در تمامی غلظت‌های مصرفی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند و افزایش غلظت اسانس هل سبز نیز منجر به افزایش درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد شد. همچنین نتایج نشان داد، نمونه شاهد دو (نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و فاقد اسانس هل) نسبت نمونه شاهد دو (نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و فاقد اسانس هل) دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بود که البته تفاوت

درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد این دو نمونه در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نبود. در این راستا Ghushji (۲۰۰۰) و Mohtarami و Talebi (۲۰۲۱) گزارش کردند که تریتیکاله منبعی از پروآنتوسیانیدین، لیگنان‌ها و اسیدهای فنولیک است که می‌تواند بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی این غله در مقایسه با گندم نقش داشته باشد (Ghushji, 2000; Mohtarami and Talebi, 2021).

Noshad و Alizadeh Behbahani (۲۰۱۹) براساس مطالعات خود به توانایی اسانس هل سبز در مهار رادیکال‌های آزاد اشاره نمودند. همچنین Hinneburg و همکاران (۲۰۰۶) ترکیبات فنولی موجود در هل سبز را عاملی مؤثر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه که به عنوان چاشنی انواع غذاهاست، دانستند. Nair و همکاران (۱۹۹۸) در هندوستان با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هل، گزارش کردند سطوح متوسطی از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در هل وجود دارد. Khalaf و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی هل سبز را ۶۸۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که این مقدار در مقایسه با اسیداسکوربیک (نمونه شاهد) دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری بود. کوئرستین موجود در هل می‌تواند در فعالیت آنتی‌اکسیدانی مؤثر باشد. کوئرستین به دلیل داشتن دو گروه هیدروکسیل مجاور باعث افزایش قدرت احیاکنندگی و در نتیجه، افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی هل می‌شود (Noshad &Alizadeh Behbahani, 2019).



شکل ۵- اثر سطوح متفاوت اسانس هل بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دونات‌های تولیدی

حروف مشابه از نظر آماری در سطح **P<0.05** تفاوت معنی‌داری ندارند

Fig. 5. The effect of different levels of cardamom essential oil on the antioxidant activity of produced doughnuts.

Similar letters are not statistically significant at the level of P <0.05

تغییرات کپک و مخمر

جدول ۵ نشان‌دهنده اثر غلظت‌های متفاوت اسانس هل سبز (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام) و زمان (صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روز) بر میزان رشد کپک و مخمر است. نتایج نشان داد، اسانس هل سبز و افزایش غلظت آن بر تغییرات کپک و مخمر دونات‌های تولیدی در طول زمان اثر داشت. بدین صورت که غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس هل سبز بیشترین خواص ضدمیکروبی را نسبت به سایر غلظت‌های اسانس (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام) داشت. همچنین نتایج حاکی آن بود که بیشترین رشد کپک و مخمر در نمونه شاهد از روز سوم به بعد بود، این در حالی است که فعالیت کپک و مخمر در نمونه های حاوی ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس هل سبز در روز ششم مشاهده نشد. نکته قابل توجه آنست که روند رشد کپک و مخمر در نمونه شاهد دو (نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و فاقد اسانس هل) نسبت به شاهد یک (نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم و فاقد آرد تریتیکاله، صمغ دانه ریحان و اسانس هل) مقداری کندتر بود که این امر می‌تواند تحت تأثیر ترکیبات فنولی موجود در آرد تریتیکاله باشد. لازم به ذکر است با وجود مشاهده اختلاف در میزان رشد کپک و مخمر، این دو نمونه از لحاظ آماری (P<0.05) تفاوت معنی‌داری نداشتند که به احتمال زیاد در نمونه‌های حاوی بیش از ۱۵ درصد آرد تریتیکاله امکان مشاهده تغییرات معنی‌دار در روند رشد کپک و مخمر در مقایسه با شاهد یک وجود دارد.

جدول ۵- اثر سطوح متفاوت اسانس هل بر رشد کپک و مخمر دونات‌های تولیدی طی مدت زمان نگهداری بر حسب $log\ cfu\ g^{-1}$

Table 5- The effect of different levels of cardamom essential oil on the growth of mold and yeast in doughnuts produced during storage according to log cfu g-1

Treatments تیمارها	Shelf life (days) زمان نگهداری (روز)		
	0	3	6
Control 1 (no triticale flour-basil gum and cardamom essential oil) شاهد یک (فاقد آرد تریتیکاله- صمغ ریحان و اسانس هل)	-	3.49±1.17[a]	5.94±0.34[a]
Control 2 (15% triticale flour and 0.50% basil gum) شاهد دو (۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ ریحان)	-	3.12±0.29[a]	3.97±0.66[b]
15% triticale flour+ 0.50% gum+ 50 ppm essential oil ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۵۰ پی پی ام اسانس	-	2.31±0.06[ab]	2.45±1.24[bc]
15% triticale flour + 0.50% gum + 100 ppm essential oil ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس	-	1.08±0.27[bc]	2.19±0.11[c]
15% triticale flour + 0.50% gum +150 ppm essential oil ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۱۵۰ پی‌پی‌ام اسانس	-	-	-
15% triticale flour + 0.50% gum + 200 ppm essential oil ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس	-	-	-

Treatments تیمارها	Shelf life (days) زمان نگهداری (روز)		
	9	12	15
Control 1 (no triticale flour-basil gum and cardamom essential oil) شاهد یک (فاقد آرد تریتیکاله- صمغ ریحان و اسانس هل)	6.26±0.27[a]	6.82±0.04[a]	8.11±0.74[a]
Control 2 (15% triticale flour and 0.50% basil gum) شاهد دو (۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ ریحان)	5.95±1.04[a]	6.76±1.19[a]	7.85±0.37[a]
15% triticale flour+ 0.50% gum+ 50 ppm essential oil ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۵۰ پی‌پی‌ام اسانس	3.10±0.07[b]	5.21±0.16[ab]	6.73±0.15[a]
15% triticale flour+ 0.50% gum+ 100 ppm essential oil ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس	3.01±1.12[b]	3.07±0.09[bc]	3.97±0.26[b]
15% triticale flour+ 0.50% gum+ 150 ppm essential oil ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۱۵۰ پی‌پی‌ام اسانس	1.44±0.06[c]	3.43±1.4[bc]	3.81±0.70[b]
15% triticale flour+ 0.50% gum+ 200 ppm essential oil ۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس	1.17±1.02[c]	2.05±0.34[c]	2.94±0.61[b]

حروف مشابه در هر ستون (مربوط به زمان نگهداری) از نظر آماری در سطح $P<0.05$ تفاوت معنی‌داری ندارند.

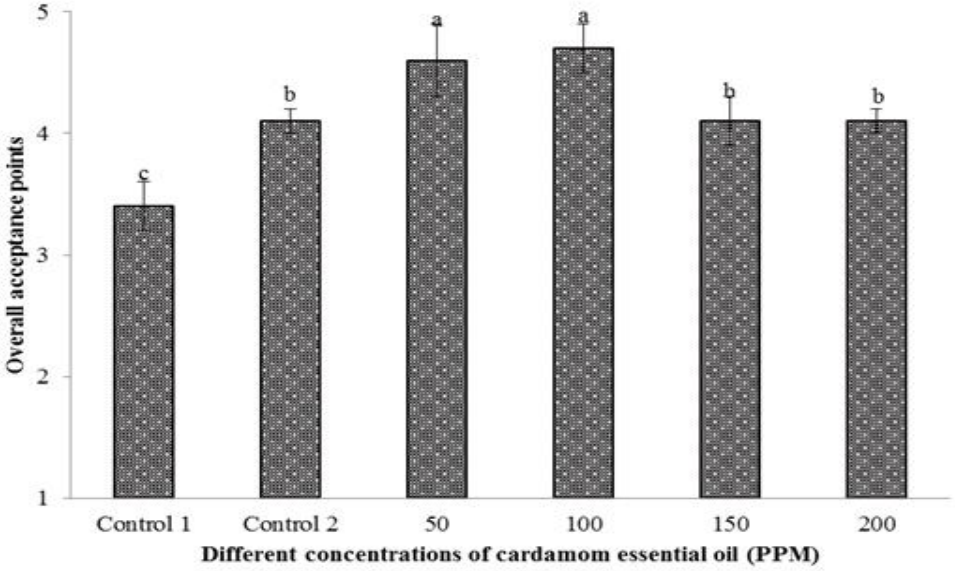
Similar letters in each column (related to storage time) were not statistically significant at the level of $P<0.05$.

آرد تریتیکاله نیز به‌عنوان منبع پروآنتیوسیانیدین، لیگنان‌ها و اسیدهای فنولیک مشخص شده است (Zannini & Elke, 2013). ترکیبات فنولیک یا گروه هیدروکسیل آزاد به‌عنوان فعال‌ترین ترکیبات ضدمیکروبی شناخته شده‌اند (Tabatabaei-Yazdi et al., 2019). Safaei Borj و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند حضور زنجبیل در کلوچه سنتی سبزوار با به تأخیر انداختن رشد کپک ارتباط مستقیم داشت که علت این امر می‌تواند به دلیل ترکیبات فنولی و پلی فنولی در زنجبیل باشد. بر اساس پژوهش Gandomi و همکاران (۲۰۰۹) یک اسانس زمانی یک جلوگیری کننده از رشد مثبت تلقی می‌شود که شکل‌گیری عامل مورد نظر تا ۵۰ درصد کاهش پیدا کند. در پژوهش حاضر اسانس هل سبز در تمام غلظت ها حتی در غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام توانست شکل‌گیری کپک و مخمر در دونات ترکیبی بر پایه آرد گندم و تریتیکاله که یکی از اهداف اصلی این تحقیق و در عین حال هدف کاربردی در این پژوهش بود را کاهش دهد، هرچند که هیچ کدام از غلظت‌ها نتوانستند به‌طور کامل از رشد کپک در محصول هدف جلوگیری کنند. لازم به ذکر است در غلظت‌های بیش از ۵۰ پی‌پی‌ام اسانس هل سبز، کاهش بار قارچی بیش از ۵۰ درصد بود. در مجموع بار قارچی نمونه دونات‌های تولیدی در غلظت ۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام در مقایسه با شاهد یک به‌ترتیب ۱۷/۰۲ و ۶۳/۷۵ درصد کاهش یافت. این در حالی است که بار قارچی نمونه دونات‌های تولیدی در غلظت ۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام در مقایسه با شاهد دو به‌ترتیب ۱۴/۲۷ و ۶۲/۵۵ درصد کاهش یافت. این امر نشان‌دهنده آن است که در غلظت‌های بیش از ۵۰ پی‌پی‌ام، اسانس هل سبز می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدمیکروبی و جلوگیری کننده از رشد مثبت تلقی شود. روند کاهشی بار قارچی نمونه دونات‌های تولیدی در غلظت ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام به‌ترتیب ۵۱/۰۵، ۵۳/۰۳ و ۶۳/۷۵ درصد بود. Husain و Ali

(۲۰۱۴) در بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس هل سبز بر تعدادی از سویه‌های باکتریایی و قارچی، نشان دادند اسانس هل سبز اثر ضدمیکروبی بالایی بر تمامی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی داشتند. براساس نتایج آنالیز شیمیایی اسانس هل سبز مشخص گردید ترکیبات Eucalyptol، ۲-Terpinenylacetate، a-Terpineol، Linalool و Sabinene از ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس هستند و این ترکیبات به همراه دیگر ترکیبات با ماهیت فنولیک یا گروه هیدروکسیل آزاد همگی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی شناخته شده اند (Noshad & Alizadeh Behbahani, 2019). ترکیبات فنلی اسانس در لایه فسفولیپید غشای سلول گیاه ساخته شده و هرچقدر میزان این ترکیبات فنلی در اسانس بیشتر باشد، اثر ضدمیکروبی اسانس نیز بیشتر خواهد بود (Singh et al., 2002). El Malti و همکاران (۲۰۰۷)، Kaushik و همکاران (۲۰۱۰) و Kubo و همکاران (۱۹۹۱) نیز نتایج مشابهی مبنی بر اثر ضدمیکروبی هل سبز گزارش کردند.

ویژگی‌های حسی

جدول ۶ نشان‌دهنده ویژگی‌های حسی نمونه‌های دونات و شکل ۵ نشان‌دهنده پذیرش کلی آن‌هاست. همانطور که نتایج نشان داد حضور اسانس هل و افزایش غلظت آن بر فرم و شکل و پوسته، بافت، پوکی و تخلخل و قابلیت جویدن نمونه دونات‌های تولیدی اثر معنی‌داری (P<0.05) نداشت. لازم به ذکر است امتیاز بافت، قابلیت جویدن و پوکی و تخلخل و بو و مزه شاهد دو (نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و فاقد اسانس هل) بیش از شاهد یک (نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم و فاقد آرد تریتیکاله، صمغ دانه ریحان و اسانس هل) بود. این در حالی بود که امتیاز پوسته و فرم و شکل هر دو نمونه شاهد مشابه بود و این دو نمونه به لحاظ ویژگی‌های ظاهری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری (P<0.05) که منجر به امتیازدهی نابرابر شود، نداشتند. در بین نمونه‌های شاهد (یک و دو)، نمونه‌ای که بافت بهتری داشت از عطر و طعم بهتری نیز برخوردار بود که این امر بدان دلیل است که رهایش عطر و مزه در نمونه‌ها با بافت بهتر، بیشتر اتفاق می‌افتد. Koliandris و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند درک بو و مزه و رهایش مواد مولد آن‌ها بستگی به نوع بافت نمونه دارد و در بافت‌هایی که پیوستگی بیشتر است و بافت خوشایند مصرف‌کننده یا ارزیابان چشایی است، درک بو و مزه بیشتر است (Koliandris et al., 2008).



شکل ۵- اثر سطوح متفاوت اسانس هل بر امتیاز پذیرش کلی دونات‌های تولیدی

حروف مشابه از نظر آماری در سطح P<0.05 تفاوت معنی‌داری ندارند

Fig. 5. The effect of different levels of cardamom essential oil on the overall acceptance score of produced doughnuts

Similar letters are not statistically significant at the level of P <0.05

جدول ٦- اثر سطوح متفاوت اسانس هل بر ویژگی‌های حسی دونات‌های تولیدی

Table 6- The effect of different levels of cardamom essential oil on the sensory properties of produced doughnuts

Sensory properties ویژگی‌های حسی	Treatments تیمارها

Porosity پوکی و تخلخل	Crust پوسته	Form and shape فرم و شکل	
3.40± 0.81[b]	4.20± 0.71[a]	4.40± 0.56[a]	**Control 1 (no triticale flour-basil gum and cardamom essential oil)** **شاهد یک (فاقد آرد تریتیکاله-صمغ ریحان و اسانس هل)**
4.60± 0.62[a]	4.20± 0.66[a]	4.60± 0.62[a]	**Control 2 (15% triticale flour and 0.50% basil gum)** **شاهد دو (۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ ریحان)**
4.43± 0.77[a]	4.60± 0.74[a]	4.20± 0.71[a]	**15% triticale flour+ 0.50% gum+ 50 ppm essential oil** **۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۵۰ پی‌پی‌ام اسانس**
4.43± 0.77[a]	4.23± 0.82[a]	4.37± 0.67[a]	**15% triticale flour+ 0.50% gum+ 100 ppm essential oil** **۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس**
4.20± 0.71[a]	4.43± 0.77[a]	4.40± 0.72[a]	**15% triticale flour+ 0.50% gum+ 150 ppm essential oil** **۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۱۵۰ پی‌پی‌ام اسانس**
4.40± 0.56[a]	4.20± 0.71[a]	4.30± 0.77[a]	**15% triticale flour+ 0.50% gum+ 200 ppm essential oil** **۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس**

Odor and taste بو و مزه	Chewiness قابلیت جویدن	Firmness and softness سفتی و نرمی بافت	Treatments تیمارها
	Sensory properties ویژگی‌های حسی		
3.30± 0.98[c]	3.30± 0.64[c]	3.80± 0.71[b]	**Control 1 (no triticale flour-basil gum and cardamom essential oil)** **شاهد یک (فاقد آرد تریتیکاله-صمغ ریحان و اسانس هل)**
4.20± 0.71[b]	4.20 ±0.98[b]	4.37± 0.72[a]	**Control 2 (15% triticale flour and 0.50% basil gum)** **شاهد دو (۱۵ درصد آرد تریتیکاله و ۰/۵۰ درصد صمغ ریحان)**
4.60± 0.62[ab]	4.60± 0.79[ab]	4.80± 0.77[a]	**15% triticale flour+ 0.50% gum+ 50 ppm essential oil** **۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۵۰ پی‌پی‌ام اسانس**
4.80± 0.41[a]	4.80± 0.40[a]	4.43± 0.40[a]	**15% triticale flour + 0.50% gum + 100 ppm essential oil** **۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس**
4.20± 0.66[b]	4.20± 0.76[b]	4.60± 0.77[a]	**15% triticale flour+ 0.50% gum+ 150 ppm essential oil** **۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۱۵۰ پی‌پی‌ام اسانس**
4.20± 0.71[b]	4.20 ±0.63[b]	4.43± 0.62[a]	**15% triticale flour+ 0.50% gum+ 200 ppm essential oil** **۱۵ درصد آرد تریتیکاله+ ۰/۵۰ درصد صمغ+ ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس**

حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح P<0.05 تفاوت معنی‌داری ندارند.

Similar letters in each column are not statistically significant at the level of P <0.05.

Boland و همکاران (۲۰۰۴) این امر را به طریق دیگری توجیه کردند و اعتقاد داشتند برهمکنش‌های بین مواد مولد بو و مزه در محصولات با بافت و ساختار مناسب بهتر اتفاق افتاده است که این امر منجر به افزایش احساس دهانی خوب و رهایش هرچه بیشتر مواد طعم‌زا می‌شود (Boland et al., 2004). همچنین نتایج حاکی از آن بود که اسانس هل به شدت بر امتیاز بو و مزه نمونه‌ها تأثیرگذار بود. بدین صورت که امتیاز بو و مزه دونات‌های تولیدی تا غلظت ۱۰۰ پی پی‌ام اسانس هل روند صعودی و پس از آن روند نزولی را طی کرد و در نهایت بیشترین امتیاز بو و مزه به نمونه حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس هل و کمترین امتیاز بو و مزه به نمونه حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس تعلق گرفت و حتی امتیاز بو و مزه نمونه حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس هل از هر دو نمونه شاهد (نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم و فاقد آرد تریتیکاله، صمغ دانه ریحان و اسانس هل و نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و فاقد اسانس هل) کمتر بود. در نهایت می‌توان گفت نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و ۱۰۰ پی پی ام اسانس هل از بیشترین امتیاز پذیرش کلی برخوردار بود و این نمونه به‌عنوان بهترین نمونه این پژوهش به لحاظ ویژگی‌های حسی معرفی می گردد.

نتیجه‌گیری

این تحقیق با هدف تولید دونات فراسودمند کم‌چرب با کیفیت و طعم مطلوب انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد با جایگزینی ۱۵ درصد آرد گندم با آرد تریتیکاله در حضور ۰/۵۰ درصد صمغ دانه

ریحان در فرمولاسیون دونات می‌توان نمونه‌ای با محتوی روغن و سفتی بافت کمتر و حجم و تخلخل بیشتر در مقایسه با نمونه حاوی ۱۰۰ درصد آرد گندم تولید نمود. همچنین نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که بهترین نمونه به لحاظ بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رشد کپک و مخمر نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس هل است. اما نمونه حاوی ۱۵ درصد آرد تریتیکاله، ۰/۵۰ درصد صمغ دانه ریحان و ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس هل از بیشترین امتیاز ویژگی‌های حسی، کمترین میزان محتوی روغن و سفتی بافت، بیشترین حجم و تخلخل برخوردار بود و این نمونه به عنوان بهترین نمونه این پژوهش معرفی می‌گردد.

منابع

1. .Larrauri, J. A., Sánchez-Moreno, C., & Saura-Calixto, F. (1998). Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, *46*(7), 2694-2697. https://doi.org/10.1021/jf980017p.
2. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods Committee. (2000). Approved methods of the American association of cereal chemists (Vol. 1). Amer Assn of Cereal Chemists.
3. Azuma, J. I., & Sakamoto, M. (2003). Cellulosic hydrocolloid system present in seed of plants. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, *15*(81), 1-14. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.015.
4. Boland, A. B., Buhr, K., Giannouli, P., & van Ruth, S. M. (2004). Influence of gelatin, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavour compounds from model gel systems. *Food chemistry*, 86(3), 401-411. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.015.
5. El Malti, J., Mountassif, D., & Amarouch, H. (2007). Antimicrobial activity of Elettaria cardamomum: Toxicity, biochemical and histological studies. *Food chemistry*, 104(4), 1560-1568. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.043.
6. Fazeli, A., Mazaheri-Tehrani, M., Karimi, M., Sadeghian, A., & Koocheki, A. (2019). The Effect of Xanthan, Guar and Transglutaminase on the Physicochemical and Textural Properties of Gluten-free Doughnut. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, *8*(1), 1-14. DOI: 10.22101/JRIFST.2019.04.30.811.
7. Fraś, A., Gołębiewska, K., Gołębiewski, D., Mańkowski, D. R., Boros, D., & Szecówka, P. (2016). Variability in the chemical composition of triticale grain, flour and bread. *Journal of Cereal Science*, 71, 66-72. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.06.016.
8. Funami, T., Funami, M., Tawada, T., & Nakao, Y. (1999). Decreasing oil uptake of doughnuts during deep-fat frying using curdlan. *Journal of Food Science*, 64(5), 883-888. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15933.x
9. Gandomi, H., Misaghi, A., Basti, A. A., Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A., & Javan, A. J. (2009). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil on growth and aflatoxin formation by Aspergillus flavus in culture media and cheese. *Food and chemical toxicology*, *47*(10), 2397-2400. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.024.
10. Ghorbani, M., Sheikhalaslami, Z., & Arianpour, A. (2018). The effect of basil and tragacanth gums on quality and shelf life of doughnut. *Journal of Food Research*, *28*(3), 139-151.
11. Ghushji, F. (2000). Triticale: The first man-made grain. Carno Express, Tehran.
12. Hejrani, T., Sheikholeslami, Z., Mortazavi, A., & Davoodi, M. G. (2017). The properties of part baked frozen bread with guar and xanthan gums. *Food Hydrocolloids*, *71*, 252-257. DOI:10.1016/j.foodhyd.2016.04.012.
13. Hinneburg, I., Dorman, H. D., & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food chemistry*, *97*(1), 122-129. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.028.
14. Husain, S. S., & Ali, M. (2014). Analysis of volatile oil of the fruits of *Elettaria cardamomum* (L.) Maton and its antimicrobial activity. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS)*, *3*(2), 1798-1808.
15. Jalali, M., Sheikholeslami, Z., Elhamirad, A. H., Khodaparast, M. H. H., & Karimi, M. (2019). The effect of balangu shirazi (*lallemantia royleana*) gum on the quality of gluten-free pan bread containing pre-gelatinized simple corn flour with microwave. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, *11*(2). https://doi.org/10.34302/crpjfst/2019.11.2.6.
16. Kante-Traore, H., Sawadogo-Lingani, H., Parkouda, C., Samadoulougou–Kafando, J. P., and Dicko, M. H. (2018). Mango doughnuts technology process for innovative prevention of post-harvest loss of mango fruits in Burkina Faso. *African Journal of Food Science*, 12(4), 63-72.
17. Kaushik, P., Goyal, P., Chauhan, A., & Chauhan, G. (2010). In vitro evaluation of antibacterial potential of dry fruitextracts of Elettaria cardamomum Maton (*Chhoti Elaichi*). *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, *9*(3), 287.
18. Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., & Farah, H. (2008). Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*, *32*(1), 51-55.

19. Khorsand, M., Aliabadi, M., & Jarrahiferiz, J. (2018). The Effect of Adding Flour Soy and Lentil to Doughnut on its Physicochemical Properties. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, *7*(2), 197-212. DOI:10.22101/JRIFST.2018.07.17.726.
20. Kim, J. H., Maeda, T., & Morita, N. (2006). Effect of fungal α-amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours. *Food Research International*, *39*(1), 117-126.
21. Kim, J., Choi, I., Shin, W. K., & Kim, Y. (2015). Effects of HPMC (Hydroxypropyl methylcellulose) on oil uptake and texture of gluten-free soy donut. *LWT-food Science and Technology*, *62*(1), 620-627.
22. Koliandris, A., Lee, A., Ferry, A. L., Hill, S., & Mitchell, J. (2008). Relationship between structure of hydrocolloid gels and solutions and flavour release. *Food Hydrocolloids*, *22*(4), 623-630.
23. Kubo, I., Himejima, M., & Muroi, H. (1991). Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *Elettaria cardamomum* (Zingiberaceae) seed. *Journal of agricultural and food chemistry*, *39*(11), 1984-1986.
24. Kwinda, O., Onipe, O. O., & Jideani, A. I. (2018). The effect of oat bran and psyllium husk fibre on oil reduction and some physicochemical properties of magwinya–a deep-fried dough. *CyTA-Journal of Food*, *16*(1), 247-254.
25. Li, W., Cui, S. W. and Kakuda, Y. (2006). Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat ßglucans. *Journal of Carbohydrate polymer*, 63: pp, 408-416. DOI:10.1016/j.carbpol.2005.09.025.
26. Lim, S. M., Kim, J., Shim, J. Y., Imm, B. Y., Sung, M. H., and Imm, J. Y. (2012). Effect of poly-γ-glutamic acids (PGA) on oil uptake and sensory quality in doughnuts. Food Science and Biotechnology, 21(1), 247-252.
27. Makinen, O.E. and Arendt, E. K. (2012). Oat malt as baking ingredient a comparative study of impact of oat, barley and wheat malts on bread and dough properties. *Journal of Cereal Science*, 56: 753-747.
28. Matuda, T. G., Chevallier, S., Filho, P. A., Lebail, A. and Tadini, C. (2008). Impact of guar and xanthan gums on proofing and calorimetric parameters of frozen bread dough. *Journal of Cereal Science*. 48: 741-746. DOI:10.1016/j.jcs.2008.04.006.
29. Mohtarami, F., & Talebi, A. (2021). The Effect of Triticale Flour and Betaglucan on Physicochemical, Textural and Sensory Properties of Barbari Bread. *Journal of food science and technology (Iran)*, *18*(113), 351-361. DOI:10.29252/fsct.18.04.28.
30. Mortazavi, A., & Yousefzadeh Sani, S. (2017). Evaluation of the effect of adding basil and xanthan gums and ultrasonic treatment and oil content and quality properties of chicken nuggets. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 9(1), 71-80.
31. Nair, S., Nagar, R. and Gupta, R. (1998). Antioxidant phenolics and flavonoids in common Indian foods. *The Journal of Assoc Physicians India*, 46(8): 798-710. PMID: 11229280.
32. Najaf Najafi, M., Hadad, K. M. H., Rajabzadeh, N., & Mortazavi, S. (2008). Study on the possibility of using a mixture of rye and wheat flour in making Iranian Barbary bread. *Journal of Food Science and Technology*, 5(16), 21-28.
33. Noshad, M., & Behbahani, B. A. (2019). Identification of chemical compounds, antioxidant activity, and antimicrobial effect of Elettaria cardamomum essential oil on a number of pathogenic microorganisms in vitro. *Qom University of Medical Science Journal*, 13(2), 57-69. DOI: 10.29252/qums.13.2.57.
34. Pourhaji, F., Karimi, M., Tavakoli pour, H., Sheikholeslami, Z. (2011). Effect of green tea extract and ascorbic acid on chemical and organoleptic properties and colour of doughnut. *Food Processing and Preservation Journal*, 4 (2): 29-43.
35. Pourmohammadi, K., Aalami, M., Shahedi, M., & Sadeghi Mahoonak, A. R. (2011). Effects of microbial transglutaminase on the quality of wheat bread supplemented with hull-less barley flour. *Electronic Journal of Food Processing and Preservation*, *2*(2), 81-98.
36. Purlis, E., & Salvadori, V. O. (2009). Modelling the browning of bread during baking. *Food research international*, *42*(7), 865-870. DOI:10.1016/j.foodres.2009.03.007.
37. Quasem, J. M. Mazahreh, S. A., Abu-Alruz, K, Afaneh, I. A., Al-Muhtaseb, A. H. and Magee, T. R. A. (2009). Effect of methyl cellulose coating and pre-treatment on oil uptake, moisture retention and physical properties of deep-fat fried starchy dough system. A*merican Journal of Agriculture and Biological Science*, 4: 156-166. DOI:10.3844/ajabssp.2009.156.166.
38. Rajabi Ahmad Abad, H., Sheikholeslami, Z. (2014). Effect of tortilla flour and tragacanth gum on quality properties and rheology of mixed bread (wheat-triticale). Third National Conference on Food Science and Industry, Ghuchan, Iran.
39. Rezaei, N. (2017). Investigating the possibility of reducing the amount of fried donut oil using a paste coating based on pre-gel starch and two hydrocolloids. Faculty of AgricultureR. Islamic Azad University of Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran.
40. Sabbaghi, H. (2021). Application of hydrocolloid compounds (xanthan and carboxymethylcellulose) in doughnut formulation for reducing oil uptake. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 18:1. DOI:10.22067/ifstrj.v18i1.87648.

41. Sabbaghi, H., Ziaiifar, A., Kashaninejad, M. (2018). Fractional conversion modeling of color changes in apple during simultaneous dry-blanching and dehydration process using intermittent infrared irradiation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 14(2), 383-397. DOI:10.22067/ifstrj.v0i0.62293.
42. Safaei Borj, D., Sadat Noortajali, K., Jamshidi Moghadam, A., & Safaei Borj, M. (2014). The effect of ginger as a natural alternative in increasing the shelf life of cookies. The second national conference on production chain optimization, distribution and consumption in the food industry, Sari, Iran.
43. Saguy, I. S., and Pinthus, E. J. (1995). Oil uptake during deep-fat frying: factors and mechanism. *Food technology* (Chicago), 49(4), 142-145.
44. Sahraiyan, B. (2016). Production of sorghum malt powder using microwave and investigation of the possibility of replacing this substance with sucrose in gluten-free oil cake. Faculty of Agriculture. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
45. Sahraiyan, B., Naghipour, F., Karimi, M. & Ghiafeh davoodi, M. (2013). Evaluation of Lepidium sativum seed and guar gum to improve dough rheology and quality parameters in composite rice-wheat bread. *Food Hydrocolloid*. 30: 698-703. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.08.013.
46. Sakhale, B. K., Badgujar, J. B., Pawar, V. D. and Sananse, S. L. (2011). Effect of hydrocolloids incorporation incasing of samosa on reduction of oil uptake. *Journal of Food Process Technology*, 3(2): 120-133. DOI:10.1007/s13197-011-0333-0 .
47. Saldivar, S. O., Flores, S. G. and Rios, R. V. (2014). Potential of triticale as substitute for wheat in flour production. *Cereal Chemistry*, 81: pp, 220-225. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.2.220.
48. Salehi, F., gohari, A. A., Satorabi, M., & Souri, F. (2017). Effect of basil seed gum on batter and rice cake properties. *Journal of food science and technology*, 70 (14), 315-323.
49. Salvador, A., Sanaz, T. and Fiszman, S. M. (2008). Performance of methyl cellulose in coating batter for fried products. *Food hydrocolloids*, 22: 1062-1067. DOI:10.1016/j.foodhyd.2007.05.015.
50. Sciarini, L. S., Maldonado, F., Ribotta, P. D., Prez, G. T. and Leon, A. E. (2009). Chemical composition and functional properties of Gleditsia triacanthos gum. *Food Hydrocolloids*, 23: 306-313. DOI:10.1016/j.foodhyd.2008.02.011.
51. Sheikholeslami, Z., Karimi, M., Ghiyafeh, D. M., Sahraiyan, B., & Naghipour, F. (2018). The influence of chubak extraction and Basil seed gum on texture and appearance of strudel produced by frozen dough. *Journal of food science and technology*, 71 (14), 159-169.
52. Singh, N., Singh, R., Bhunia, A. and Stroshine, R. (2002). Efficacy of chorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing Escherichia coli O157: H7 On lettuce and baby carrots. *LWT-Food Science and Technology*, 35(8); 720-729. https://doi.org/10.1006/fstl.2002.0933.
53. SirichoNworraNit, S., Intasen, P. and AngNawut, C. (2016). Quality of donut supplemented with Hom Nin rice flour. World Academy of Science, Engineering and Technology, International of Biological, Bio molecular, Agricultural, *Food and Biotechnological Engineering*, 10(7): 443-446. https:/doi.org/10.5281/zenodo.1125777.
54. Sun, D. (2008). Computer vision technology for food quality evaluation. Academic Press, New York, USA.
55. Tabatabaei-Yazdi, F., Falah, F., Behbahani, B. A., Vasiee, A., & Mortazavi, S. A. (2019). Identification of Chemical Compounds, Antioxidant Potential, Phenolic Content and Evaluation of Inhibitory and Bactericidal/Fungicidal Effects of Ginger Essential Oil on Some Pathogenic Microorganisms *in Vitro*. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 13(3), 52-60. DOI: 10.29252/qums.13.3.50.
56. Zannini, E. and Elke, K. (2013). Arendt, Cereal grain for food and beverage industries: A Volumein woodhead publishing series, *Technology and Nutrition*, 17, Pp, 45-54.
57. Ziaiifar, A. M. and Sabbaghi, H. (2018). Frying process engineering, chapter 7: oil uptake reduction in frying process. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Press.
58. Zolfaghari, Z., Mohebbi, M. and Haddad Khodaparast, M.H. (2013). Quality changes of donuts as influenced by leavening agent and hydrocolloid coating. *Journal of Food Process*. Pres. 37, 34-45. DOI:10.1111/j.1745-4549.2011.00611.x.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 330- 342

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۴۲-۳۳۰

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Evaluation of the effect of non-thermal plasma on the physicochemical, technological and functional properties of wheat flour

Seyed Amir Tavakoli Lahijani[1], Fakhri Shahidi[*1], Mahmoud Habibian[3], Arash Koocheki[1]

Received: 2020.08.16
Accepted: 2020.10.03

How to cite this article:
Tavakoli Lahijani, S, A., Shahidi, F., Habibian, M., Koocheki, A. (2022). Evaluation of the effect of non-thermal plasma on the physicochemical, technological and functional properties of wheat flour. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 330-342.

Abstract

Introduction: Bread has a major role in the diet of people in Iran. One of the important factors affecting the quality of bread is the quality of wheat flour protein called gluten. Gluten is the principal structure forming elements of most baked products, contributing to the elasticity, cohesiveness and viscosity characteristics of the dough. Thus, gluten substantially control the quality of wheat flour based products. Due to the importance of the role of gluten and the requirement for improving the flour quality, providing a simple, economical, and efficient method to improve the technical quality of wheat and bread is also an important and controversial challenge. Oxidizing agents are generally added to the wheat flour to accelerate the natural maturing and the flour becomes paler and yields dough with improved baking properties. However, increasing concern about their adverse effects has highlighted the need for the development of alternative oxidants. Atmospheric cold plasma (ACP) is an emerging advanced oxidation process which has recently drawn considerable interest from food scientists. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of non-thermal plasma treatments on the properties of wheat flour.

Materials and Methods: For this purpose, medium wheat flour was prepared from local silages and treated with ACP at 25V for 0, 2, 4, 6, 8 and 10 min. Chemical composition of flour samples (moisture content, protein and ash) were determined using standard methods (AACC, 2002). Color properties, damaged starch water soluble index, wet gluten, gluten index, zeleny and falling number values, water and oil absorption capacities, swelling power and solubility of wheat flour samples were also measured.

Results and Discussion: The results obtained from the measurement of properties for the treated and untreated flour showed that the water and oil absorptions, swelling power, and solubility, wet gluten, gluten index, Zeleny number and whiteness increased significantly with increasing time, while the pH, moisture content, b * and a * indices, were decreased by plasma treatment. In addition, the results showed that ACP conditions have a significant effect on functional properties that can be created floursand products with various characteristics. The results showed that plasma treatment affected the gluten index and wet gluten and techno functional properties of wheat flour. Overall, this study demonstrated that non-thermal plasma is a quick, efficient way to improve the technological properties of wheat flour, as an alternative to chemical oxidants.

Keywords: Cold plasma, Gluten, modification, Technological properties, Wheat flour

1. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: fshahidi@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.V19I1.88117

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 330- 342

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۴۲-۳۰۷

مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی تأثیر پلاسمای غیرحرارتی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد گندم

سیدامیر توکلی لاهیجانی[۱]- فخری شهیدی[۱*]- محمود حبیبیان[۲]- آرش کوچکی[۱]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۲

چکیده

نظر به اهمیت نقش گلوتن در محصولات غله‌ای به‌ویژه نان و ضرورت اصلاح آرد، ارایه یک روش ساده، اقتصادی و کارا به‌منظور بهبود کیفیت تکنولوژیکی گندم و نان تولیدی، همچنان یک چالش مهم و بحث‌برانگیز می‌باشد. در این پژوهش تأثیر تکنولوژی نوین پلاسمای غیرحرارتی بر بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد گندم بررسی شد. بدین منظور آرد گندم با گلوتن متوسط تهیه و تحت تاثیر زمان اعمال تیمار پلاسمای سرد (زمان صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ دقیقه) قرار گرفتند. نتایج آزمون‌های فیزیکوشیمیایی نشان داد که با افزایش زمان اعمال تیمار پلاسما، مقدار pH و رطوبت کاهش اما مقدار گلوتن مرطوب، اندیس گلوتن و حجم رسوب زلنی افزایش یافت، اندازه‌گیری پارامترهای کیفی و عملکردی آرد گندم نشان داد پارامتر *L، درصد نشاسته آسیب‌دیده، اندیس حلالیت، ظرفیت جذب آب و روغن و قدرت تورم آرد گندم افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) یافت، در حالی که پارامترهای *a، *b و عدد فالینگ کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) پیدا کرد. بنابراین می‌توان از تکنولوژی نوین پلاسمای سرد به‌ویژه زمان ۸ دقیقه در بهبود ویژگی‌های کیفی و عملکردی آرد گندم استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آرد، اصلاح، پلاسمای غیر حرارتی، گلوتن، گندم.

مقدمه

گندم اساسی‌ترین غله تأمین‌کننده غذای انسان است. در ایران نیز گندم، نان و سایر فرآورده‌های تولیدی از گندم بخش اساسی رژیم غذایی را تشکیل می‌دهند. در سال‌های اخیر کیفیت نان‌های ایرانی کاهش یافته که یکی از دلایل مهم آن مناسب نبودن کیفیت آردهای مورد استفاده برای تولید نان است (Sheikholeslami et al., 2010). کیفیت نان تا حدود زیادی به کمیت و کیفیت پروتئین آرد گندم یا همان گلوتن بستگی دارد. این پروتئین که گندم را از سایر غلات متمایز می‌نماید، نقش مهمی در تشکیل شبکه خمیر و ویژگی‌های خمیر و نان دارد (Patrignani et al., 2014; MacRitchie, 1984). نان‌های با گلوتن ضعیف اغلب بافت داخلی زبر، حجم کم و کیفیت پایینی داشته و از آن خمیری شل به‌دست می‌آید و نهایتاً حجم نان حاصل کمتر می‌شود. به‌منظور بهبود کیفیت آرد، یا باید آرد را برای مدتی نگهداری و هوادهی کرد یا از بهبوددهنده‌ها استفاده نمود تا بتوان با اکسیداسیون اجزاء مختلف آرد کیفیت آرد تولیدی را افزایش داد (Shahmiri et al., 2016). بهبوددهنده‌های شیمیایی ویژگی‌های فیزیکی گلوتن را اصلاح می‌کنند، به‌نحوی که نانی با کیفیت بهتر حاصل می‌شود ولی گزارش‌های متعددی در زمینه خطرناک بودن این مواد برای سلامتی بدن موجود است. به‌طوریکه برومات پتاسیم سبب بروز ضایعات سیستم عصبی می‌گردد و مقادیر بالای آن سمی است و یا آمونیوم پرسولفات سبب ایجاد بیماری های آلرژیک می‌گردد (Coultate, 2009). لذا با توجه به اهمیت نان در زنجیره غذایی، ضرورت یافتن و استفاده از روش‌های ایمن و ارزان از اهمیت زیادی برخوردار است. در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی با تمرکز بر توسعه و دستیابی به تکنولوژی‌های نوین غیرحرارتی انجام پذیرفته است. عمدتا محبوبیت تکنولوژی‌های نوین غیرحرارتی به علت جلوگیری از اثرات نامطلوب فرایندهای حرارتی بر ماتریکس‌های غذایی است.

پلاسمای غیرحرارتی نیز تکنولوژی نوینی است که می‌توان با استفاده از آن، گروه‌های عاملی مختلف را بر سطوح مواد نشاند یا از تاثیر اکسیداسیون جزیی آن بر ترکیبات غذایی و بهبود ویژگی‌های نهایی فراورده‌های غذایی، استفاده نمود. در واقع پلاسمای غیرحرارتی به گاز یونیزه شده‌ای اطلاق می‌گردد که بخش کوچکی از اتم‌های آن یک یا چند الکترون از دست داده و به یون‌های مثبت تبدیل شده باشد. پلاسما شامل یون‌های مثبت، الکترون، اتم و یا مولکول‌های گاز خنثی،

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- استادیار، گروه مهندسی شیمی، پژوهشکده نفت، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: fshahidi@um.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.V19I1.88117

امواج UV، رادیکال‌های آزاد و مولکول‌ها و اتم‌های برانگیخته است (Fernandez et al., 2010; Fernandez & & Thompson, 2012). تاکنون اغلب مطالعات درباره کاربرد پلاسمای سرد بر مواد غذایی در حوزه اثرات میکروب‌زدایی و آلودگی‌زدایی انجام شده است و تأثیر این تکنولوژی نوین بر ترکیبات شیمیایی و ماکرومولکول‌های غذایی کمتر بررسی شده است. تحقیقاتی محدود نشان داده‌اند که این تکنولوژی توانایی اصلاح ویژگی‌های عملکردی ماکرومولکول‌ها مانند گلوتن موجود در آرد گندم (Menkovsk a et al ., 2014; Misra et al., 2015; Thirumdas et al., 2015; Zhang et al., 2014; Pankaj et al., 2015) و پروتئین آب پنیر (Segat et al., 2015) را داشته است. بنابراین با توجه به ضرورت استفاده از روش‌ها و ترکیبات بی‌خطر و نیز کاهش مدت زمان رسانیدن آرد، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر زمان مختلف اعمال تیمار پلاسما بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد حاصل از گندم بود.

مواد و روش‌ها

تهیه آرد و روش اعمال تیمار پلاسمای سرد

آرد گندم از کارخانه آرد ایران در استان تهران با درجه استخراج ۸۷ درصد تهیه گردید. آرد مورد استفاده ۱۳/۰۵ درصد رطوبت و ۱۱/۶۷ درصد پروتئین بود. آرد مورد استفاده در کیسه‌های پلاستیکی از جنس پروپیلن بسته‌بندی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سیستم پلاسمای مورد استفاده در این پژوهش از نوع سد دی‌الکتریک می‌باشد، که از دو الکترود موازی با شکل هندسی دایره‌ای تشکیل شده بود. برای بررسی تأثیر تیمار پلاسما از گاز هوا و شرایط اتمسفر معمولی استفاده گردید. در هر بار مقدار ۸ گرم نمونه آرد به صورت یکنواخت در سطح الکترود زیرین ریخته شده و تیماردهی در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ دقیقه و در ولتاژ ۲۵ ولت صورت پذیرفت.

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه آرد گندم طی زمان اعمال تیمار پلاسمای سرد

pH نمونه‌های آرد با استفاده از pHمتر و ترکیب شیمیایی نمونه‌های آرد با استفاده از روش‌های استاندارد (AOAC, 1990) اندازه‌گیری شد. برای تعیین رطوبت از آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، تعیین پروتئین از روش کلدال (N× ۵/۷) و تعیین خاکستر از کوره ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. از استاندارد (AACC, 2002) (روش شماره ۱۱- ۳۸ و روش شماره ۱۲ -۳۸) و با استفاده از دستگاه گلوتن‌شوی خودکار (مدل ۲۲۰۰، برابندر، آلمان) جهت تعیین میزان گلوتن مرطوب و اندیس گلوتن استفاده شد. درصد گلوتن باقیمانده روی توری‌های دستگاه اندازه‌گیری گلوتن به کل گلوتن به‌عنوان اندیس گلوتن در نظر گرفته شد. حجم رسوب زلنی نیز بر حسب میلی‌لیتر مطابق استاندارد (AACC, 2002) (شماره ۱۱-۵۴) انجام پذیرفت.

ارزیابی ویژگی‌های کیفی و عملکردی نمونه آرد گندم طی زمان اعمال تیمار پلاسمای سرد

بررسی پارامترهای رنگ

برای تعیین پارامترهای رنگ (L*، a* و b*) نمونه‌های آرد، از رنگ‌سنج دیجیتال (مدل CR- 410، کونیتا مینولتا سنسینگ، ژاپن) استفاده شد. از یک پلیت پلاستیکی با قطر ۵۸ میلی‌متر و عمق ۱۵ میلی‌متر برای قرار دادن نمونه و اندازه‌گیری پارامترهای رنگ استفاده گردید. کالیبراسیون اولیه دستگاه از طریق کاشی استاندارد سفید صورت گرفت.

مقدار آسیب‌دیدگی نشاسته

برای اندازه گیری آسیب‌دیدگی نشاسته از روش غیرآنزیمی سریع و بر مبنای روش McDermott با اصلاحات جزیی انجام شد (McDermott, 1980). محلول استخراج کننده شامل ۱/۶۷ درصد اسید تری‌کلرو استیک و ۰/۵ درصد تیوسیانات پتاسیم و محلول رنگ‌کننده شامل ۰/۲ درصد کریستال ید و ۲ درصد یدور پتاسی بود. به مقدار ۰/۵ گرم آرد، ۲۰ میلی‌لیتر محلول استخراج‌کننده اضافه شد و عمل استخراج طی ۱۵ دقیقه انجام گردید. پس از صاف شدن محلول با کاغذ واتمن شماره یک، مقدار ۲ میلی‌لیتر به بالن ۲۵ میلی‌لیتری منتقل و ۱ میلی‌لیتر محلول رنگ‌کننده به آن اضافه گردید. بالن به حجم رسانده شد و پس از ۳۰ دقیقه، مقدار جذب محلول در طول موج ۶۰۰ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر (یو وی ۲۶۰۱، رای‌لی، چین)، خوانده شد و مقدار نشاسته آسیب دیده از طریق رابطه ۱ بر حسب فاراند به‌دست آمد.

آسیب‌دیدگی نشاسته = (۰/۹۷× جذب)+ ۲/۱ (۱)

ارزیابی فعالیت آلفاآمیلازی آرد

اندازه‌گیری فعالیت آلفا آمیلازی آرد با استفاده از روش استاندارد (AACC, 2002) (شماره ۸۱-۵۶) و با دستگاه فالینگ نامبر (مدل ۱۶۰۰، شرکت پرتن، سوئد) انجام شد. این روش بر اساس قابلیت منحصر به فرد آنزیم آلفاآمیلاز جهت مایع کردن ژل نشاسته است. فعالیت آنزیمی به‌وسیله عدد فالینگ اندازه‌گیری می‌شود که زمان مورد نیاز برای هم زدن و اجازه دادن به همزن برای سقوط در یک فاصله اندازه‌گیری شده در یک ژل آردی داغ تحت شرایط مایع کردن و بر حسب ثانیه می‌باشد.

میزان اندیس حلالیت در آرد

بررسی میزان حلالیت آرد بر اساس روش Ravaghi و همکاران (۲۰۱۰) با کمی اصلاحات انجام شد. ۴ گرم نمونه در ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر توسط اولتراتوراکس به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ هموژن گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g× ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. میزان حلالیت آرد یا همان میزان کل مواد جامد محلول در فاز رویی، از طریق خشک کردن فاز رویی و تقسیم کردن وزن آن بر وزن نمونه تعیین گردید (Ravaghi et al., 2010).

ظرفیت جذب آب و روغن

اندازه‌گیری ظرفیت جذب آب و روغن بر اساس روش Feyzi و همکاران (۲۰۱۵) انجام گرفت. یک گرم آرد داخل یک لوله سانتریفوژ ریخته شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان یا آب مقطر به آرد اضافه گردید و با استفاده از ورتکس (ریکس کنترل، هایدولف، آلمان)، به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد. پس از این مرحله نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و در مرحله بعد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت g× ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند و فاز رویی (روغن یا آب) جدا گردید. ظرفیت جذب آب و روغن به‌صورت حجم آب یا روغن جذب شده (میلی‌لیتر) توسط هر گرم آرد، از طریق رابطه ۲ محاسبه گردید (Feyzi et al., 2015).

(۲) وزن آرد /(حجم اولیه آب یا روغن– حجم آب یا روغن جدا شده پس از سانتریفوژ)= ظرفیت جذب آب یا روغن

تعیین قدرت تورم

اندازه‌گیری قدرت تورم نمونه‌های آرد بر اساس روش Obadi و همکاران (۲۰۱۸) با اندکی تغییرات انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم آرد داخل لوله های آزمایش دربدار ریخته شد. سپس ۱۵ گرم آب مقطر به آرد اضافه شده و پس از همزدن، در حمام آب گرم در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. نمونه‌های حرارت داده شده با حمام آب سرد به سرعت تا دمای اتاق سرد شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g× ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند و فاز رویی جدا گردید. سپس وزن لوله به همراه رسوب به دقت اندازه‌گیری شد و پس از کم کردن وزن خالی لوله، وزن فاز باقیمانده (رسوب) محاسبه شد. قدرت تورم به‌عنوان درصد رسوب باقیمانده با استفاده از رابطه ۳ تعیین شد (Obadi et al., 2018).

(۳) (وزن آرد /وزن فاز رسوب)= قدرت تورم

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش به‌منظور بررسی تاثیر تیمارهای پلاسما، از طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به‌منظور بررسی اثر زمان اعمال تیمار پلاسما (صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ دقیقه)، در ولتاژ ۲۵ ولت بر خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد گندم با استفاده از طرح کاملا تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) صورت گرفت، نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) آنالیز و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل (Excel, 2007) استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه آرد گندم طی زمان اعمال تیمار پلاسمای سرد

نتایج تأثیر زمان مختلف اعمال تیمار پلاسما سرد بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه آرد گندم در جدول ۱ نشان داده شده است.

pH

با توجه به آنچه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود با افزایش مدت زمان اعمال تیمار پلاسما، میزان pH نمونه‌ها به شکل معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P\leq ۰/۰۵$). به‌گونه‌ای که با توجه به نتایج به‌دست آمده، بالاترین میزان pH مربوط به نمونه شاهد و به میزان ۶/۴۴ و پایین‌ترین مقدار از pH در نمونه تحت تیمار پلاسما به مدت ۱۰ دقیقه مشاهده شد که به میزان ۵/۸۹ رسیده بود. اعمال تیمار پلاسمای سرد موجب تغییراتی در آرد می‌شود که این امر خود را با کاهش pH نشان داد. Misra و همکاران (۲۰۱۵) بیان داشتند که طی اعمال پلاسما گاز اوزون، امواج UV، گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و نیز الکترون تولید می‌شود که خاصیت اکسیدکنندگی قوی و یا توانایی اصلاح ساختار ماکرومولکول‌ها را دارند. در پژوهش انجام شده توسط (Misra et al., 2015) در زمینه اثرگذاری تیمار پلاسمای سرد اتمسفری روی ویژگی‌های عملکردی آرد گندم، مشخص شد که اعمال تیمار پلاسما موجب تغییر ساختار پروتئین موجود در آرد و همچنین تغییر ویژگی‌های سطحی گرانول‌های نشاسته موجود در ساختار آرد شده که این امر موجب تغییر پروفایل گروه‌های عاملی اسیدهای‌آمینه موجود در ساختار پروتئین آرد (گلوتن) و همچنین تغییر بار سطحی گرانول‌های نشاسته خواهد شد که در نهایت pH را در این سیستم کمپلکس تغییر و کاهش خواهد داد. Segat و همکاران (۲۰۱۵) نیز در بررسی تیمار پلاسمای سرد بر پروتئین آب پنیر بیان داشتند که میزان و شدت کاهش pH کاملا متأثر از واکنش گروه‌های فعال رادیکالی حاصل از اکسیژن و نیتروژن و همچنین واکنش مولکول‌های اوزون و گونه‌های تولید شده

با آمینو اسیدها است به گونه‌ای که اکسید شدن گروهای سولفیدریلی آمینواسیدها توسط گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) ، منجر به افزایش تشکیل اتصالات دی سولفیدی داخل و خارج مولکولی، و نیز تشکیل اسید سولفنیک یا سولفوریک می‌شود. علاوه بر این گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) منجر به تشکیل نیتروژن اسید (HNO_2) و اسید نیتریک (HNO_3) از NO و NO_2 می‌شوند و در نهایت کاهش pH را به همراه دارند (Segat et al, 2015). در پژوهشی Sarangapani و همکاران (۲۰۱۵) در مورد بررسی اثر پلاسما با فشار کم بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد برنج پیش پخت نیز به اثرگذاری گروه‌های فعال رادیکالی تولید شده در زمان برقرای جریان پلاسما بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آرد برنج پیش‌پخت اشاره داشتند (Sarangapani et al., 2015). علاوه بر این، Lee و همکاران (۲۰۱۷) کاهش pH آرد را به اکسیداسیون کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها و اسیدهای چرب غیراشباع ناشی از گاز اوزون نسبت دادند که در طی آن، ترکیبات و گروه‌های عاملی اسیدی به‌وجود آمده و در نتیجه pH آرد کاهش می‌یابد (Lee et al., 2017).

جدول ۱- تأثیر زمان مختلف اعمال تیمار پلاسمای سرد بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آرد گندم

Table 1- The effect of different time of cold plasma treatment on physicochemical properties of wheat flour

مدت زمان اعمال تیمار پلاسما (دقیقه) Time (min)	pH	رطوبت (درصد) Moisture (%)	خاکستر (درصد) Ash (%)	پروتئین درصد Protein (%)	گلوتن مرطوب (درصد) Wet gluten (%)	اندیس گلوتن (درصد) Gluten index (%)	حجم رسوب زلنی Volume of Zelani sediment
0	6.44± 0.04^{a}	12.80± 0.03^{a}	0.765± 0.007^{a}	11.42± 0.18^{a}	23.1± 0.03^{e}	52.6± 0.2^{f}	18.25± 0.17^{d}
2	6.38± 0.02^{b}	12.75± 0.05^{b}	0.768± 0.009^{a}	11.51± 0.09^{a}	23.3± 0.05^{d}	57.5± 0.1^{e}	18.79± 0.2^{cd}
4	6.24± 0.00^{c}	12.72± 0.04^{bc}	0.766± 0.001^{a}	11.35± 0.06^{a}	24.9± 0.06^{c}	60.3± 0.1^{d}	19.02± 0.23^{c}
6	6.10± 0.01^{d}	12.68± 0.06^{c}	0.770± 0.004^{a}	11.41± 0.11^{a}	25.3± 0.04^{b}	66.4± 0.3^{c}	22.65± 0.42^{b}
8	5.91± 0.02^{e}	12.70± 0.03^{c}	0.772± 0.01^{a}	11.61± 0.2^{a}	25.8± 0.07^{a}	68.3± 0.2^{a}	23.34± 0.8^{a}
10	5.89± 0.08^{e}	12.66± 0.01^{d}	0.772± 0.007^{a}	11.67± 0.14^{a}	25.1± 0.1^{bc}	65.9± 0.8^{b}	32.70± 0.8^{b}

*بر اساس وزن خشک

رطوبت

مقدار رطوبت موجود در گندم و آرد یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر کیفیت آن است، زیرا مقدار مواد خشک آرد و دانه بستگی به مقدار رطوبت دارد. با توجه به جدول ۱، اعمال مدت زمان تیمار پلاسما تأثیر معنی‌داری بر درصد رطوبت نمونه‌های آرد داشت. با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین میزان رطوبت، در تیمار شاهد (۱۲/۸۰ درصد وزنی- وزنی) و پایین‌ترین رطوبت در تیمار تحت اعمال پلاسما به مدت ۱۰ دقیقه(۱۲/۶۶ درصد وزنی- وزنی) مشاهده شد. با اعمال تیمار پلاسما میزان رطوبت به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش یافت که این امر می‌تواند در ارتباط با افزایش دما در هنگام برقراری تیمار پلاسما و نقش آن در خشک کردن فرآورده باشد. به‌گونه‌ای که با افزایش زمان اعمال پلاسما از صفر دقیقه به ۱۰ دقیقه، میزان انرژی اسمی منتقل شده به نمونه‌های آرد بالاتر بوده و در نهایت از میزان محتوای رطوبتی آن کاسته می‌شود. نتایج این پژوهش مشابه یافته‌های پژوهش انجام شده توسط (Pankaj et al, 2018) در مورد اثرگذاری پلاسما بر ویژگی‌های عملکردی ترکیبات موجود در مواد غذایی بوده که بنابر گزارش این پژوهشگران، دیپلیمریزاسیون ترکیبات درشت مولکول‌ها همانند نشاسته، هیدروکلوئیدها و پروتئین، موجب تسریع خروج رطوبت در اثر اعمال تیمارهای پلاسمای شدید است. همچنین نتایج مشابهی در پژوهش انجام شده توسط Bubler و همکاران (۲۰۱۵) در مورد بررسی تأثیر پلاسمای سرد بر خروج رطوبت از پروتئین نخود گزارش گردید (Bubler et al., 2015).

خاکستر

خاکستر به مجموعه مواد معدنی اطلاق می‌شود که بیشتر در لایه‌های بیرونی دانه غلات انباشته شده و غالبا در عملیات آسیاب از گندم جدا می‌شود. خاکستر موجود در آرد شاخصی از درصد استخراج آرد از گندم است که می‌تواند در کیفیت نهایی محصول و رنگ آن تأثیر بگذارد. نتایج ارزیابی‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان تیمار پلاسما، میزان خاکستر به‌طور نامحسوسی افزایش یافت اما تفاوت معنی‌داری میان خاکستر نمونه‌ها مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). احتمالا این افزایش به‌دلیل خروج رطوبت نمونه‌ها بر اثر اعمال تیمار پلاسما و افزایش سهم سایر اجزا بوده است. نتایج این پژوهش با نتایج Mehrafza (۲۰۱۶) و نیز Mendez و همکاران (۲۰۰۳) در مورد استفاده از گاز اوزون به‌عنوان بهبوددهنده خواص آرد در زمان‌های

مختلف اوزون‌دهی مطابقت داشت (Mendez et al., 2003; Mehrafza et al., 2016).

پروتئین

پروتئین‌های گندم به‌عنوان بهترین اجزای تعیین‌کننده کیفیت آرد شناخته شده‌اند و داشتن پروتئین بیشتر، اغلب با کیفیت نانوایی بهتر همراه است. اما به‌طور کلی مقدار پروتئین نمی‌تواند شاخص مناسبی برای تعیین کاربرد آردهای مختلف باشد. زیرا کیفیت پروتئین مهم‌تر از کمیت آن است که از طریق شاخص‌هایی مانند اندیس گلوتن و عدد زلنی تعیین می‌گردد. مطابق جدول ۱، با افزایش مدت زمان اعمال پلاسما، افزایش نامحسوسی در میزان پروتئین نمونه‌ها مشاهده شد ولی این تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند ($P>0/05$). دلیل افزایش اندک مقدار پروتئین با اعمال تیمار پلاسما را می‌توان اینگونه توجیه کرد که با توجه به خروج رطوبت در طی اعمال تیمارهای پلاسما، مشاهده افزایش درصد پروتئین نمونه‌ها قابل توجیه است. Mei و همکاران (۲۰۱۶) و نیز Lee و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی اثر زمان مختلف اعمال گاز اوزون بر نمونه آردهای مختلف نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند (Mei et al., 2016; Lee et al., 2017).

گلوتن مرطوب

گلوتن مرطوب مجموعه پروتئین‌های غیرمحلول در آب و قابل استخراج از گندم است که از دو بخش گلوتنین و گلیادین تشکیل شده است. نقش اصلی گلوتنین ایجاد خاصیت ویسکوالاستیک و حالت دادن به خمیر است و نقش اصلی گلیادین جذب آب و تورم آرد است (Payan, 2006). با افزودن آب به آرد، این پروتئین‌ها به یکدیگر پیوند یافته و یک کمپلکس پروتئینی و توده به‌هم پیوسته‌ای را تشکیل می دهد که به آن شبکه گلوتنی می‌گویند (Cauvain, 2015). همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، زمان اعمال تیمار پلاسما تأثیر معنی‌داری بر میزان گلوتن مرطوب داشت به‌گونه‌ای که با افزایش زمان اعمال پلاسما، میزان گلوتن مرطوب به شکل معنی‌داری افزایش یافت. حداقل میزان گلوتن مرطوب در نمونه شاهد مشاهده گردید. آرد تحت تیمار پلاسما به مدت ۲ دقیقه تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت ولی پس از آن با افزایش زمان اعمال تیمار پلاسما، افزایش معنی‌داری در میزان گلوتن مرطوب مشاهده شد ($P<0/05$) به‌گونه‌ای که افزایش میزان گلوتن مرطوب در مدت زمان ۸ دقیقه حداکثر بود و سپس اندکی کاهش داشت. Misra و همکاران (۲۰۱۵) بیان داشتند که یکی از گونه‌های فعالی که در طی اعمال پلاسما تولید می‌شود گاز اوزون می‌باشد که خاصیت اکسیدکنندگی قوی دارد. از گونه‌های فعال دیگری که در طی پلاسما تولید می‌شود رادیکال‌ها و گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن است. بنابراین علت افزایش میزان گلوتن مرطوب در این پژوهش را می‌توان اینگونه بیان کرد که طی اعمال تیمار پلاسما، به علت اکسیداسیون پروتئین آرد، پیوندهای دی‌سولفیدی جدیدی میان زنجیره‌های مختلف پروتئین بوجود می‌آید و یا آنکه گروه‌های دی سولفیدریل با پیوندهای دی‌سولفیدی موجود وارد واکنش می‌گردند و شبکه قوی‌تری را تشکیل می‌دهند که باعث افزایش میزان گلوتن مرطوب می‌گردد (Misra et al., 2015). این نتایج با یافته‌های حاصل از پژوهش‌های Mei و همکاران (۲۰۱۶) و Lee و همکاران (۲۰۱۷) در رابطه با اثر اکسیداسیون گاز اوزون بر نمونه آردهای مختلف مطابقت داشت که محققان بیان داشتند اکسیداسیون باعث باز شدن و تجمع مجدد گلوتن غیرمحلول و تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی شده و شبکه قوی‌تری تشکیل می‌شود. البته نتایج این محققان نشان داد با اکسیداسیون اضافی در زمان طولانی اعمال تیمار اوزون، یا غلظت‌های بالای گاز اوزون، ساختار گلوتن تخریب می‌شود و میزان گلوتن مرطوب و خواص جذب آب و ویسکوزیته خمیر کاهش پیدا می‌کند (Mei et al., 2016; Lee et al., 2017).

اندیس گلوتن

میزان پروتئین و مقدار گلوتن مرطوب نمی‌تواند به تنهایی معیاری برای کیفیت آرد استحصالی از گندم برای مصارف مختلف باشد. در تعیین خواص کاربردی یک آرد، موضوع قابل اهمیت، کیفیت گلوتن است که در ایجاد ویژگی‌های رئولوژیکی خمیر نقش به‌سزایی دارد. کیفیت گلوتن با آزمایشات مختلفی ارزیابی می‌شود ولی دو روش اندیس گلوتن و عدد زلنی بیشتر استفاده می‌شود. اندیس گلوتن نشان‌دهنده نسبت گلوتن مرغوب به گلوتن نامرغوب و در واقع گویای کیفیت گلوتن است. همانطور که در جدول ۱ مشخص است، زمان اعمال تیمار پلاسما تأثیر معنی‌داری بر اندیس گلوتن دارد و با افزایش مدت زمان اعمال پلاسما اندیس گلوتن روند افزایشی از خود نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، بالاترین میزان از اندیس گلوتن در تیمار ۸ دقیقه و به میزان ۶۸/۳ درصد و پایین‌ترین میزان از این اندیس در نمونه شاهد به میزان ۵۳/۶ درصد مشاهده شد. Pankaj و همکاران (۲۰۱۸) اشاره داشتند که تغییرات اکسیداتیو پروتئین ممکن است وزن مولکولی و حلالیت آن‌ها را تغییر دهد و در نتیجه در تعاملات با آب توانایی آن‌ها برای تشکیل شبکه گلوتن را تغییر دهد (Pankaj et al., 2018). اکسیداسیون پروتئین‌ها توسط پلاسمای سرد پدیده اصلی است که می‌تواند باعث اصلاح حلالیت پروتئین و خواص تکنولوژیکی آرد شود. بسیاری از محققان معتقدند طی اکسیداسیون بر اثر تیمار پلاسما بخشی از پروتئین‌های گلوتن باز شده و زمینه برای واکنش و تشکیل پیوندهای جدید دی‌سولفیدی فراهم می‌گردد. علاوه بر این اکسیداسیون گروه

های عاملی موجود در سطح پروتئین، زمینه را برای افزایش تعداد و همچنین افزایش قدرت پیوندهای دی‌سولفیدی و در نتیجه تشکیل یک شبکه گلوتنی مستحکم فراهم می‌کند (Bahrami et al., 2016; Misra et al., 2015). به‌طورکلی قرار گرفتن آرد در معرض اکسیدانت‌ها می‌تواند سبب افزایش قدرت خمیر به‌واسطه اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل شود. سطوح بالای انرژی پلاسمای سرد باعث تغییر پروتئین و لیپید می‌شود تا حدی که قابلیت‌های آرد را تغییر می دهد. البته افزایش مدت زمان اکسیداسیون یا غلظت بالای اکسیدانت می‌تواند با تخریب فراکسیون گلوتن‌های با وزن مولکولی بالا باعث کاهش اندیس گلوتن شود (Zare Bahnamiri et al., 2016; Sheikholeslami et al., 2009).

حجم رسوب زلنی

اساس آزمون تعیین عدد زلنی بر این است که اگر پروتئین‌های گلوتن در آب یا محلول‌های شیمیایی رقیق قرار بگیرند، آب جذب کرده و متورم می‌شوند و به شکل رسوب ته‌نشین می‌شوند. بیشتر بودن محتوای گلوتن و بهتر بودن کیفیت آن سبب افزایش عدد زلنی می‌شود. بنابراین ارتباط مثبتی بین حجم رسوب و استحکام شبکه گلوتنی وجود دارد (Sheikholeslami et al., 2009). جدول ۱ تأثیر زمان اعمال تیمار پلاسما بر عدد زلنی آرد گندم را نشان می‌دهد. همانطور که واضح است عدد زلنی در تمامی نمونه‌ها با افزایش مدت زمان اعمال پلاسما افزایش یافت و البته مشابه موارد قبل در زمان‌های کمتر این تغییرات معنی‌دار نبود ولی با افزایش بیشتر زمان اعمال پلاسما از ۴ دقیقه به بالا عدد زلنی نمونه‌های آرد افزایش معنی‌داری پیدا کرد. دلیل نتیجه حاصل را می‌توان اکسیداسیون زیر واحدهای گلوتن و ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی در آن‌ها عنوان نمود. استفاده از فراصوت (Boyaghchi, 2016) و گاز اوزون (Mehrafza et al., 2016) برای اصلاح ویژگی‌های آرد نیز نتایج مشابهی داشت که علت آن را اکسیداسیون و باز شدن پروتئین گلوتن و تشکیل پیوندهای جدید دی‌سولفیدی عنوان کردند. Misra و همکاران (۲۰۱۵) و Segat و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند، تیمار پلاسما بر اساس اکسیداسیون و تشکیل گونه‌های جدید مانند رادیکال‌های آزاد و اکترون‌ها می‌تواند باعث باز شدن و تشکیل پیوندهای جدید در پروتئین‌ها گردد (Misra et al., 2015; Segat et al., 2015).

ارزیابی خصوصیات کیفی و عملکردی نمونه آرد گندم طی زمان اعمال تیمار پلاسمای سرد

نتایج تاثیر زمان‌های مختلف اعمال تیمار پلاسمای سرد بر ویژگی‌های کیفی و عملکردی نمونه آرد گندم در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- تاثیر زمان مختلف اعمال تیمار پلاسمای سرد بر خصوصیات کیفی و عملکردی آرد گندم

Table 2- The effect of different time of cold plasma treatment on quality and functional properties of wheat flour

مدت زمان اعمال تیمار پلاسما (دقیقه) Time (min)	L*	a*	b*	نشاسته آسیب دیده (درصد) Damaged starch (%)	عدد فالینگ (ثانیه) Falling number (s)	اندیس حلالیت (درصد) Solubility index (%)	قدرت تورم (گرم) Swelling power (g)
0	89.26± 0.14^{e}	-1.63± 0.13^{a}	8.10± 0.07^{a}	5.88± 0.03^{d}	403± 0.03^{e}	4.93± 0.2^{d}	6.25± 0.17^{e}
2	89.87± 0.12^{e}	-1.97± 0.13^{b}	8.30± 0.1^{a}	6.02± 0.08^{c}	425± 0.03^{c}	5.02± 0.2^{d}	6.77± 0.17^{d}
4	90.44± 0.23^{d}	-2.5± 0.1^{c}	7.78± 0.03^{b}	6.12± 0.1^{bc}	433± 0.03^{c}	5.35± 0.2^{c}	7.62± 0.17^{c}
6	91.26± 0.18^{c}	-3.2± 0.19^{d}	6.65± 0.1^{c}	6.2± 0.02^{b}	465± 0.03^{a}	5.93± 0.2 ^{b}	7.97± 0.17^{bc}
8	91.65± 0.1^{b}	-3.98± 0.03^{e}	6.10± 0.07^{d}	6.23± 0.04^{b}	450± 0.03^{b}	6.46± 0.2^{a}	8.61± 0.17^{a}
10	92.80± 0.07^{a}	-4.59± 0.26^{f}	5.26± 0.04^{e}	6.41± 0.09^{a}	413± 0.03 ^{d}	6.39± 0.2^{a}	8.30± 0.17^{b}

بررسی پارامترهای رنگ

رنگ آرد گندم یکی از ویژگی‌های مهم است که بر رنگ محصولات نهایی و پذیرش آن‌ها تأثیرگذار است. جدول ۲ بررسی پارامترهای رنگ، یعنی میزان اندیس L* (میزان روشنایی)، a* (قرمزی- سبزی) و b* (زردی- آبی) را در زمان‌های مختلف اعمال تیمار پلاسما نشان می‌دهد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود با افزایش مدت زمان اعمال تیمار پلاسما، میزان روشنایی نمونه‌های آرد، به شکل معنی‌داری افزایش یافت (P≤ ۰/۰۵)، با این حال، افزایش مدت زمان تیمار پلاسما، اندیس b* و a* را به شکل معنی‌داری کاهش داد (P≤ ۰/۰۵). بالاترین میزان از اندیس روشنایی یا L* مربوط به نمونه تیمار شده با پلاسما به مدت ۱۰ دقیقه و به میزان ۹۲/۸۰ و پایین ترین مقدار روشنایی نیز در نمونه شاهد و به میزان ۸۹/۲۶ مشاهده شد. در مورد اندیس a* نیز، بالاترین مقدار مربوط به تیمار شاهد به میزان ۱/۶۳- و پایین‌ترین میزان از اندیس a* در نمونه تحت تیمار پلاسما

به مدت ۱۰ دقیقه و به میزان ۴/۵۹- به‌دست آمد. در مورد اندیس b* نیز بالاترین میزان در نمونه تیمار شده به مدت ۲ دقیقه و به میزان ۹/۰۳ که تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت و پایین‌ترین میزان از اندیس b* به میزان ۵/۲۶ در نمونه ۱۰ دقیقه تیمار شده با پلاسما مشاهده شد. طبق پژوهش‌های انجام شده توسط (Pal et al, 2016) که به بررسی اثر پلاسما بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دانه برنج و نیز که به بررسی اثر پلاسما بر ویژگی‌های برنج قهوه‌ای و باسماتی پرداخته بودند، نتایج بیانگر افزایش سفیدی همزمان با افزایش اندیس L* در تیمارهای برنج بود (Thirumdas et al., 2016; Thirumdas et al., 2015). این پژوهشگران علت بروز این پدیده را این‌گونه بیان داشتند که پلاسمای اتمسفری حاوی مقدار زیادی مولکول‌های فعال همانند (اوزون، اکسید نیتریک، پراکسید، رادیکال هیدروکسیل و غیره است که با حداقل انرژی در دمای اتاق در مدت چند ثانیه تا چند دقیقه بدون فرایند حرارتی تولید می‌شوند و به شدت با ترکیبات رنگی موجود در آرد واکنش داده و این امر موجب اکسیداسیون در آن‌ها خواهد شد. این اکسیداسیون موجب روشن‌تر شدن رنگ در فرآورده نهایی شده و بنابراین پارامتر L* افزایش و هم زمان a* و b* رو به کاهش می‌گذارد. این نتایج نشان می‌دهد که پلاسما توانایی اکسید کردن پیگمان‌های زرد و قرمز آرد گندم از قبیل کاروتنوئیدها، لوتئین، پیش پیگمان‌های کاروتنوئید که دارای پیوند مضاعف مزدوج بوده را دارا می‌باشد. همچنین در پژوهش انجام شده توسط Sui و همکاران (۲۰۱۶) که طی آن تأثیر اوزون بر نمونه‌های آرد گندم بررسی شده بود، نتایج مشابهی بدست آمد و ظاهری روشن و سفید برای نمونه‌ها به‌واسطه تجزیه رنگدانه‌های زرد طبیعی موجود به‌دست آمد. با این بررسی‌ها پلاسما می‌تواند به‌عنوان جایگزین بالقوه برای عامل سفیدکنندگی شیمیایی در آرد گندم به‌کار برده شود (Sui et al., 2016).

تعیین نشاسته آسیب‌دیده

نشاسته آسیب‌دیده به گرانول‌های نشاسته‌ای گفته می‌شود که به طور فیزیکی از حالت گرانولی اولیه خود خارج شده باشند. تغییرات در میزان نشاسته آسیب دیده در آرد می‌تواند باعث تغییراتی در میزان آب لازم، زمان اختلاط خمیر، قهوه‌ای شدن پوسته و ایجاد گاز در محصولات تخمیری آرد گردد. نشاسته آسیب‌دیده مساعد هیدرولیز توسط آمیلازها می‌باشد. طبق جدول ۲ میزان نشاسته آسیب دیده در نمونه‌های تیمار شده با پلاسما در مقایسه با نمونه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. بیشترین میزان نشاسته آسیب دیده در نمونه تحت تیمار پلاسما به مدت ۱۰ دقیقه مشاهده گردید. این نتایج نشان می‌دهد که پلاسما توانایی اکسید کردن و شکستن گرانول‌های نشاسته را دارد. این نتایج با یافته های حاصل از Mei و همکاران (۲۰۱۶) و Lee و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی اثر گاز اوزون بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی آرد گندم مطابقت داشت (Mei et al., 2016; Lee et al., 2017). این محققان بیان داشتند اکسیداسیون نشاسته توسط گاز اوزون باعث تخریب و شکست نشاسته و افزایش میزان نشاسته آسیب دیده می‌شود. نتایج تحقیقات Zhang و همکاران (۲۰۱۴) و Pal و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان داد اعمال تیمار پلاسما توانایی اکسیداسیون و شکست مولکول‌های بزرگتر نشاسته را به مولکول‌های کوچکتر دارد که این به معنای افزایش نشاسته آسیب دیده می‌باشد. بنابراین علی‌رغم اینکه پلاسما باعث کاهش فعالیت آلفاآمیلاز می‌شود، ولی با شکستن مولکول‌های بزرگ نشاسته می‌تواند این نقص را جبران نماید (Zhang et al., 2014; Pal et al., 2016).

تعیین عدد فالینگ

آرد مناسب برای نانوایی بایستی عدد فالینگ در حد متوسط و حدود ۳۰۰ ثانیه داشته باشد. کمتر از این مقدار خمیر حاصل شل بوده و بیشتر از آن، قند کافی برای تخمیر در آرد وجود نخواهد داشت. جدول ۲ نشان می‌دهد که زمان اعمال پلاسما بر عدد فالینگ تاثیر معنی داری داشته و با افزایش مدت زمان اعمال پلاسما تا مدت ۶ دقیقه، عدد فالینگ افزایش یافت که نشانه کاهش فعالیت آمیلازی آرد بود. کمترین عدد فالینگ یا بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به نمونه شاهد (بدون تیمار پلاسما) بود و بیشترین عدد فالینگ یعنی کمترین فعالیت آنزیمی پس از اعمال مدت زمان ۶ دقیقه به‌دست آمد، در زمان‌های بالاتر اعمال پلاسما، عدد فالینگ کاهش پیدا کرد که می‌تواند به علت تخریب نشاسته ناشی از اکسیداسیون و کاهش ویسکوزیته محلول باشد. با توجه به اینکه پایین بودن بیش از حد فعالیت آنزیمی آرد، باعث تخمیر نامناسب نان و در نهایت عدم کیفیت آن خواهد بود، استفاده از زمان طولانی توصیه نمی‌شود. به‌طورکلی کاهش فعالیت آنزیمی در طی اعمال تیمار پلاسما را می‌توان اینگونه تفسیر کرد که به‌دلیل اکسیداسیون آنزیم بر اثر اعمال پلاسما، ساختمان این آنزیم تخریب شده و فعالیت آن کاهش می‌یابد که با افزایش زمان این تخریب شدیدتر می‌شود تا جایی که گرانول‌های نشاسته نیز آسیب خواهند دید. Misra و همکاران (۲۰۱۶)، در مقاله مروری در مورد تأثیر پلاسما بر فعالیت آنزیم های مختلف بیان داشتند در اثر پلاسما گونه‌های فعال شیمیایی تولید می‌شوند که واکنش شیمیایی این گونه‌های فعال با آنزیم‌ها و تغییر ساختار آنزیم بویژه ساختار دوم، باعث غیر فعال شدن آنزیم‌ها می‌شوند (Misra et al., 2016). از طرفی دیگر نیز این محققان بیان داشتند در مواردی اعمال تیمار پلاسما باعث تخریب دیواره سلولی گشته و با فراهم کردن امکان تماس بیشتر آنزیم با سوبسترا فعالیت آنزیم را بیشتر می‌کنند. میزان فعال شدن یا غیرفعال شدن این آنزیم‌ها، وابسته

به نوع آنزیم و ساختار آن، شدت اعمال پلاسما، زمان اعمال آن و نوع سیستم مورد استفاده برای اعمال پلاسما، نوع گاز و نوع گونه‌های تشکیل شده و محیط واکنش دارد. به نظر می‌رسد هرچه گونه‌های فعال اکسیژن بیشتری در طی اعمال تیمار پلاسما تولید شود، واکنش این گونه‌ها با زنجیره‌های آنزیم بیشتر شده و در نهایت با تخریب ساختار آنزیم، فعالیت آنزیمی به میزان بیشتری کاهش می‌یابد (Misra et al, 2016). Mei و همکاران (۲۰۱۶)، در بررسی تأثیر گاز اوزون بر ویژگی‌های آرد گندم بیان داشتند، استفاده از گاز اوزون باعث غیرفعال شدن آنزیم آلفاآمیلاز و در نتیجه افزایش عدد فالینگ می‌شود (Mei et al., 2016).

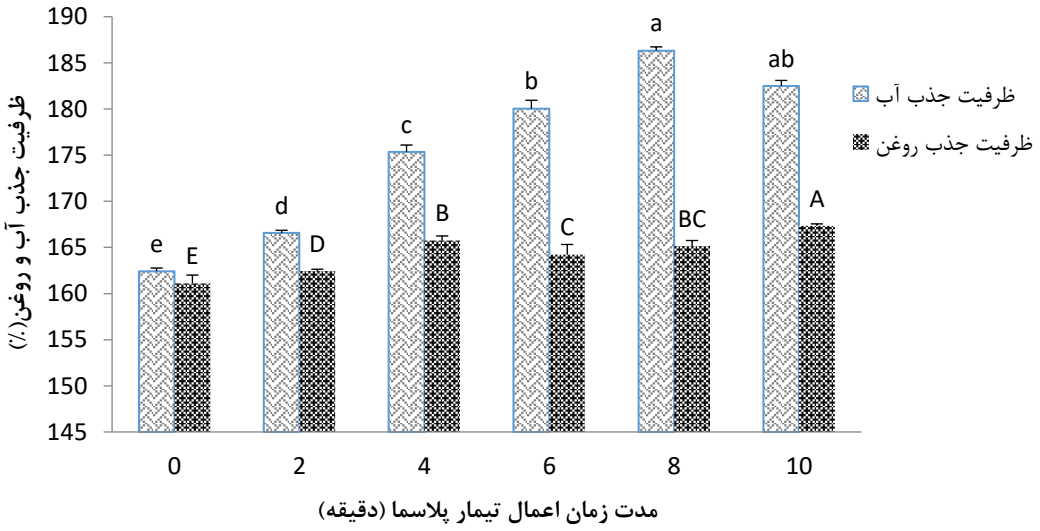
اندیس حلالیت در آب

جدول ۲ بررسی ویژگی‌های عملکردی نمونه‌های آرد در اثر اعمال تیمار پلاسما در زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد. بررسی میزان حلالیت تیمارهای آرد گندم نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان اعمال تیمار پلاسما تغییرات حلالیت کاملا محسوس بوده به‌گونه‌ای که شاهد افزایش معنی‌دار حلالیت در تیمارها بودیم ($P\leq$ ۰/۰۵). که این امر به‌ویژه در مدت زمان‌های بالای اعمال پلاسما (۱۰ دقیقه)، کاملا به چشم می‌خورد ($P\leq$ ۰/۰۵). طبق نتایج به‌دست آمده بالاترین میزان از حلالیت در نمونه تحت تیمار به مدت ۸ دقیقه و به میزان ۶/۴۶ درصد و پایین‌ترین میزان نیز در تیمار شاهد و به میزان ۴/۹۳ درصد به دست آمد. محققان مختلف در پژوهش‌های خود عنوان داشتند که اعمال پلاسما با ایجاد رادیکال‌های آزاد و شکستن سطحی‌ترین لایه مولکولی در ماکرومولکول‌ها و متعاقبا ایجاد گروه‌های عاملی در سطح پلیمر به‌واسطه واکنش این گروه‌های عاملی با یکدیگر و با مولکول‌های گازی محیط، به خوبی می‌تواند ویژگی های آبگریزی را در پلیمرهای طبیعی کاهش و ویژگی‌های کارکردی آن‌ها همانند حل‌پذیری را مطلوب سازد (Segat et al., 2014; Misra et al., 2015; Bubler et al., 2015). بر همین اساس در پژوهش جاری میزان حلالیت در تیمارهای انتهایی اعمال پلاسما به مراتب افزایش یافت که این امر ناشی از افزایش تشکیل گونه‌های فعال و واکنش گروه‌های فعال رادیکالی با ترکیبات پلیمری موجود در آرد مانند نشاسته و پروتئین است. در پژوهش Sarangapani و همکاران (۲۰۱۵) در مورد بررسی اثر پلاسمای با فشار کم روی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و همچنین کارکردی آرد برنج پیش پخت، گزارش شد که پارامتر حلالیت در آب، با افزایش مدت زمان اعمال تیمار پلاسما به ۱۰ دقیقه و همچنین افزایش توان سامانه پلاسما به ۵۰ وات، به شکل معنی‌داری بالا رفت (Sarangapani et al., 2015). این محققین علت این رخداد را مرتبط با شکست زنجیره‌های آمیلوز و آمیلوپکتین در نشاسته، همزمان با اعمال تیمار پلاسما دانسته‌اند. به عبارت دیگر شکست زنجیره‌های بلند آمیلوئیدی، موجب ایجاد اجزاء با وزن مولکولی پایین‌تر شده که این امر حلالیت نمونه‌ها را بالا می برد. نتایج حاصل از این پژوهش با یافته های Obadi و همکاران (۲۰۱۸) و Lee و همکاران (۲۰۱۷) که در تحقیقاتی جداگانه تاثیر اوزون را بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آردهای گندم بررسی کرده بودند، مطابقت داشت که علت آن را اکسیداسیون نشاسته به‌وسیله گاز اوزون دانستند که باعث تخریب ساختار نشاسته و شکست زنجیره های نشاسته می گردد (Obadi et al., 2018; Lee et al., 2017).

ظرفیت جذب آب

درصد جذب آب یکی از عوامل مهم در کیفیت آرد محسوب می‌شود که این پارامتر به کمیت و کیفیت پروتئین، میزان نشاسته و وزن مولکولی آن و نیز میزان فیبر بستگی دارد. افزایش جذب آب باعث می‌شود تا شبکه گلوتنی و در نهایت خمیر مناسب و یکنواختی تشکیل شود و ساختار مناسبی برای تولید نان پیدا کند که این خود باعث بهبود قابلیت پهن کردن خمیر، ازدیاد وزن نان و افزایش زمان ماندگاری محصول می‌گردد. طبق شکل ۱ اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها از نظر میزان جذب آب مشاهده شد به‌گونه‌ای که با اعمال تیمار پلاسما، جذب آب افزایش یافت. در همین راستا بیشترین میزان از جذب آب، در نمونه تحت تیمار پلاسما به مدت ۸ دقیقه و به میزان ۱۸۶/۳۳ درصد و پایین ترین میزان از جذب آب در تیمار شاهد و به میزان ۱۶۲/۴۱ درصد به‌دست آمد. به‌طور کلی باز شدن زنجیره های پروتئینی و قرار گرفتن گروه های هیدروفیل بیشتر در سطح و نیز شکست زنجیره‌های بلند آمیلوئیدی، و ایجاد اجزاء با وزن مولکولی پایین‌تر موجب می‌شود جذب آب ماکرومولکول‌ها افزایش یابد (Segat et al., 2014; Thirumdas et al., 2015). بر مبنای پژوهش انجام شده توسط Thirumdas و همکاران (۲۰۱۶) در مورد بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفری روی ویژگی‌های نشاسته برنج، مشخص شد که اعمال تیمار پلاسمای سرد اتمسفری بر نشاسته، باعث هیدرولیز و تشکیل زنجیره‌های با وزن مولکولی کمتر می‌شود (Thirumdas et al., 2016). از سویی دیگر اکسیداسیون سطحی گرانول‌ها در تماس با پلاسما اتفاق می‌افتد و با تغییر بار سطحی و نیز قرارگیری گروه های عاملی قطبی در سطح گرانول جذب آب نشاسته افزایش می‌یابد. Bubler و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی تاثیر پلاسمای سرد اتمسفری بر ویژگی‌های عملکردی پروتئین نخود، بیان داشتند که اوزون، اکسید نیتروژن و رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده همانند رادیکال هیدروکسیل و گونه‌های فعال نیتروژن، اشعه UV و غیره، موجب اصلاح خصوصیات سطحی پروتئین می‌گردد (Bubler et al., 2015). علاوه بر این شکست پروتئین

(دیپلیمریزاسیون) اتفاق می‌افتد. این افزایش در دیپلیمریزاسیون رابطه مستقیمی با افزایش جذب آب در تیمارها دارد چرا که باعث افزایش نسبت سطح به حجم در ذرات پلیمری موجود در نمونه‌ها شده و قابلیت واکنش آن با مولکول‌های آب را بالاتر می‌برد. یافته های حاصل از پژوهش های Obadi و همکاران (۲۰۱۸) و Lee و همکاران (۲۰۱۷) که در تحقیقاتی جداگانه تاثیر اوزون را بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آردهای گندم بررسی کرده بودند، نیز با نتایج این پژوهش مطابقت داشت که علت آن را اثر اکسیدکنندگی گاز اوزون و تخریب ساختار نشاسته و تشکیل مولکول هایی با وزن مولکولی کمتر و در نتیجه افزایش جذب آب آرد دانستند (Obadi et al., 2018; Lee et al., 2017).



شکل ۱- تأثیر مدت زمان اعمال تیمار پلاسما بر ظرفیت جذب آب و روغن آرد گندم

Fig. 1. Effect of plasma treatment duration on water and oil absorption capacity of wheat flour

ظرفیت جذب روغن

جذب روغن بیشتر یک پدیده فیزیکی است به‌طوری‌که ترکیبات و بیوپلیمرهای موجود در نمونه باعث محبوس شدن و به دام افتادن قطرات روغن در داخل خود می‌شوند. بسیاری از پژوهشگران میزان جذب روغن را بـه زنجیـره‌های غیـرقطبی پروتئین‌ها که ممکن است با زنجیره‌های جانبی هیـدروکربنـی روغن پیوند برقرار کنند نسبت داده اند. هـرچـه ظرفیـت جـذب روغـن بـالاتر باشـد میـزان اسیدهای آمینه غیرقطبی در زنجیره جانبی غالب‌تر خواهد بود (Bubler et al., 2015). علاوه بر محتوای اسیدهای آمینه در آرد، ساختار پروتئین و همچنین قطبیت سطحی پروتئین‌ها و ذرات آرد نیز بر جذب روغن موثر است. البته بیشترین تغییرات جذب روغن را به تغییرات پروتئین‌ها در طی اعمال پلاسما نسبت داده‌اند. به‌گونه‌ای که نتایج محققان نشان داده اصلاح ویژگی‌های سطحی ماتریکس‌های پروتئینی و فیبری و نیز تغییرات ساختاری پروتئین‌ها در اثر اعمال پلاسما بسیار بیشتر از مولکول‌های نشاسته می باشد (Misra et al., 2015). نتایج بررسی اثر پلاسما، بر روی جذب روغن نشان داد که تیمار پلاسما موجب افزایش معنی‌داری در میزان جذب روغن نمونه‌های آرد گندم داشته است. با توجه به شکل ۱، بالاترین میزان از جذب روغن در نمونه تحت تیمار به مدت ۱۰ دقیقه و به میزان ۱۶۵/۸۵ درصد و پایین‌ترین میزان نیز در نمونه شاهد و به میزان ۱۶۱/۱۱ درصد به‌دست آمد. این مورد بیانگر در معرض قرار گرفتن پروتئین‌های با گروه‌های عاملی غیرقطبی و همچنین افزایش آبگریزی سطحی ذرات آرد تحت تاثیر اعمال جریان پلاسما است. Bubler و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی اثر پلاسما بر روی جذب آب و چربی پروتئین نخود بیان داشتند که پلاسمای سرد موجب افزایش ظرفیت جذب آب و چربی گردید که میزان این تغییرات، وابسته به مدت زمان قرار گرفتن در معرض تیمار پلاسما و ترکیب پروتئینی می‌باشد (Bubler et al., 2015). مشابه همین یافته‌ها نیز در پژوهشی Obadi و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی اثر گاز اوزون بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد گندم، گزارش کردند در طی اعمال تیمار پلاسما، به‌دلیل اکسیداسیون نشاسته و تخریب فیزیکی و سطحی آن، خلل و فرجی در سطح نشاسته ایجاد می‌شود که اجازه می‌دهد روغن بیشتری به دام بیفتد و در نتیجه جذب روغن افزایش می‌یابد (Obadi et al., 2018).

قدرت تورم

قدرت تورم نشان‌دهنده میزان واکنش بین زنجیره‌های نشاسته در نواحی آمورف و کریستالی می‌باشد (Chan et al, 2009). افزایش قدرت تورم، تحت تأثیر نسبت آمیلوز و آمیلوپکتین، اندازه مولکول، طول زنجیره جانبی آمیلوپکتین و شکل فضایی مولکول قرار دارد (Singh & Kaur., 2004). با توجه به نتایج به‌دست آمده از جدول ۲، با افزایش مدت زمان اعمال تیمار پلاسما، قدرت تورم نمونه‌های آرد، به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرد (P≤ ۰/۰۵). بیشترین میزان از تورم، مربوط به نمونه تحت تیمار پلاسما به مدت ۸ دقیقه و به میزان ۸/۶۱ گرم و پایین‌ترین میزان از قدرت تورم در تیمار شاهد و به میزان ۶/۲۵ گرم به‌دست آمد. افزایش قدرت تورم رابطه مستقیمی با جذب آب و حلالیت ذرات آرد در اثر اعمال جریان پلاسما دارد. به عبارت دیگر برای ایجاد ویژگی‌های عملکردی ذرات آرد، ابتدا می‌بایست این ذرات حل‌پذیری مطلوبی در آب داشته باشند که زمینه‌ساز جذب آب بالاتر خواهد بود (Sarangapani et al., 2015). بر همین اساس، افزایش مدت زمان اعمال تیمار پلاسما موجب بالاتر رفتن قدرت تورم در تیمارهای آرد می‌شود. در توجیه این پدیده می‌توان گفت که حضور گروه‌های آب دوست، تشکیل پیوندهای جدید هیدروژنی و همچنین چگالی بار الکتریکی در سطح گرانول‌های نشاسته نقش حیاتی در این فرآیند دارد. چراکه با اعمال تیمار پلاسما، میزان pH در تیمارهای آرد رو به کاهش گذاشته و این سبب می‌شود گروه‌های کربوکسیل موجود در ذرات نشاسته، تمایل کمتری به از دست دادن پروتون داشته باشد و این رخداد ایجاد پیوندهای هیدروژنی را در نمونه‌های آرد در زمان انحلال در آب بالاتر برده و بنابراین نیروها یا پیوندهای ضعیف همانند پیوندهای واندروالسی که در این حالت تحریک می‌شوند بالاتر رفته و اتصال فیزیکی آب به مولکول های آرد و در نهایت، قدرت تورم بالاتر خواهد بود (Thirumdas et al, 2015). از سویی دیگر بنا بر پژوهش Pankaj و همکاران (۲۰۱۸)، اعمال تیمار پلاسما می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر بر اصلاح ویژگی‌های نشاسته مورد استفاده قرار گیرد، به‌گونه‌ای که اعمال تیمار پلاسما موجب استیلاسیون نشاسته شده و این امر ویژگی‌های آبدوستی نشاسته را بالاتر برده و هم‌زمان قدرت تورم را بهبود خواهد داد (Pankaj et al., 2018). Pal و همکاران (۲۰۱۶) نیز در بررسی اثر پلاسما روی ارقام مختلف برنج مشاهده کردند که اعمال پلاسما موجب افزایش قدرت تورم می‌شود که می‌تواند به علت قرار گرفتن گروه‌های هیدروفیل در سطح گرانول های نشاسته برنج باشد (Pal et al., 2016). تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل آمیلوز و آمیلوپکتین موجب تشکیل شبکه و نگهداری آب می‌شود. حضور این گروه‌های قطبی موجب دسترسی نواحی آمورف نشاسته به آب شده و بنابراین قدرت تورم به شکل معنی داری بالاتر خواهد رفت. در بررسی اثر گاز اوزون بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد گندم توسط Obadi و همکاران (۲۰۱۸)، نیز نتایج مشابهی گزارش شد. این محققان بیان کردند در طی اعمال تیمار اوزون و اکسیداسیون نشاسته مولکول‌هایی با وزن مولکولی کمتر تشکیل می‌شود (Obadi et al., 2018). از طرفی با واکنش گونه‌های فعال اکسیژن و تشکیل گروه‌های کربوکسیلی آبدوست در سطح گرانول های نشاسته، قدرت تورم افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر زمان‌های مختلف اعمال تیمار پلاسما بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی آرد حاصل از گندم انجام شد. طبق نتایج مربوط به آزمون‌های فیزیکو شیمیایی، با افزایش زمان اعمال تیمار پلاسما مقدار pH و رطوبت کاهش معنی‌داری یافت در حالی‌که مقدار گلوتن مرطوب، اندیس گلوتن و حجم رسوب زلنی افزایش معنی‌داری پیدا کرد، اما در مقدار خاکستر و پروتئین آرد گندم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در ادامه طبق بررسی‌های به عمل آمده در مورد ویژگی‌های کیفی و عملکردی آرد گندم مشاهده شد، با افزایش زمان اعمال تیمار پلاسما پارامتر *L، درصد نشاسته آسیب دیده، اندیس حلالیت، ظرفیت جذب آب و روغن و قدرت تورم آرد گندم افزایش معنی‌داری یافت، در حالیکه پارامترهای *a، *b و عدد فالینگ کاهش معنی‌داری پیدا کرد. این گونه به‌نظر می‌رسد که به‌طورکلی افزایش زمان اعمال تیمار پلاسما تاثیر مثبت و معنی‌داری بر بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی، کیفی و عملکردی آرد گندم داشته است و لازم است تا تحقیقات دیگری در مورد مقایسه این روش با ترکیبات شیمیایی رساننده آرد و نیز بررسی نوع ترکیبات تولید شده در طی اکسیداسیون با پلاسما از جنبه سلامتی صورت پذیرد.

منابع

1. American Association of Cereal Chemists. (2002). Approved methods of the AACC methods. 10th ed. St. Paul. Minn.
2. AOAC. (1990). Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International.
3. Bahrami, N., Bayliss, D., Chope, G., Penson, S., Perehinec, T., & Fisk, I. D. (2016). Cold plasma: A new technology to modify wheat flour functionality. *Food Chemistry*, 202, 247-253. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.113

4. Boyaghchi, M. (2016). The effect of adding vitamin C and applying ultrasound waves on physicochemical, rheological properties and bakery quality of bug wheat flour. Master Thesis, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University-Maku branch.
5. Bubler, S., Steins, V., Ehlbeck, J., & Schlüter, O. (2015). Impact of thermal treatment versus cold atmospheric plasma processing on the techno-functional protein properties from Pisum sativum 'Salamanca'. *Journal of Food Engineering*, 167, 166-174. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.036
6. Cauvain, S.P. (2015). Technology of breadmaking. 3nd ed. Springer, Cham.
7. Chan, H. T., Bhat, R., Karim, A. A. (2009). Physicochemical and functional properties of ozone-oxidized starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(13), 5965-5970. https://doi.org/10.1021/jf9008789
8. Chittrakorn, S., Earls, D., MacRitchie, F. (2014). Ozonation as an alternative to chlorination for soft wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 217-221. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.02.013
9. Coultate, T. (2009). Food: the chemistry of components. 5th ed. R.S.C.London.
10. Fernández, A., & Thompson, A. (2012). The inactivation of Salmonella by cold atmospheric plasma treatment. *Food Research International*, 45(2), 678-684. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.009.
11. Fernandez-Gutierrez, S. A., Pedrow, P. D., Pitts, M. J., Powers, J. (2010). Cold atmospheric-pressure plasmas applied to active packaging of apples. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 38(4), 957- 965. DOI: 10.1109/TPS.2010.2042078.
12. Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F., & Varidi, M. J. (2015). Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15), 3165-3176. https://doi.org/10.1002/jsfa.7056.
13. Lee, M. J., Kim, M. J., Kwak, H. S., Lim, S. T., Kim, S. S. (2017). Effects of ozone treatment on physicochemical properties of Korean wheat flour. *Food science and biotechnology*, 26(2), 435-440. https://doi.org/10.1007/s10068-017-0059-5
14. MacRitchie, F. (1984). Baking quality of wheat flours. Advances in Food and Nutrition Research, 29, 201-277. https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60058-0.
15. McDermott, E. E. (1980). The rapid non-enzymic determination of damaged starch in flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(4), 405-413. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740310411.
16. Mehrafza, E. (2016). Effect of Ozone constitutional water on physicochemical properties of bug wheat and its flour. Master Thesis, Faculty of Agriculture, SABA College of Higher Education.
17. Mei, J., Liu, G., Huang, X., Ding, W. (2016). Effects of ozone treatment on medium hard wheat (*Triticum aestivum* L.) flour quality and performance in steamed bread making. *CyTA-Journal of Food*, 14(3), 449-456. https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1133714.
18. Mendez, F., Maier, D. E., Mason, L. J., Woloshuk, C. P. (2003). Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. *Journal of Stored Products Research*, 39(1), 33-44. https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00015-2.
19. Menkovska, M., Mangova, M., Dimitrov, K. (2014). Effect of cold plasma on wheat flour and bread making quality. *Macedonian Journal of Animal Science*, 4(1), 27-3.
20. Misra, N. N., Kaur, S., Tiwari, B. K., Kaur, A., Singh, N., Cullen, P. J. (2015). Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. *Food Hydrocolloids*, 44, 115-121. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.019.
21. Misra, N.N., Pankaj, S.K., Segat, A., Ishikawa, K. (2016). Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems, *Trends in Food Science Technology*, DOI: 10.1016 /j.tifs.2016.07.001.
22. Obadi, M., Zhu, K. X., Peng, W., Sulieman, A. A., Mohammed, K., Zhou, H. M. (2018). Effects of ozone treatment on the physicochemical and functional properties of whole grain flour. *Journal of Cereal Science*, 81, 127-132. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.04.008
23. Pal, P., Kaur, P., Singh, N., Kaur, A., Misra, N. N., Tiwari, B. K., Cullen, P. J. Virdi, A. S. (2016). Effect of nonthermal plasma on physico-chemical, amino acid composition, pasting and protein characteristics of short and long grain rice flour. *Food Research International*, 81, pp.50- 57. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.019
24. Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O'Neill, L., Tiwari, B. K., Bourke, P., Cullen, P. J. (2015). Dielectric barrier discharge atmospheric air plasma treatment of high amylose corn starch films. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1076-1082. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.027
25. Pankaj, S. K., Wan, Z., Keener, K. M. (2018). Effects of cold plasma on food quality: A review. *Foods*, 7(1), 4. https://doi.org/10.3390/foods7010004
26. Patrignani, M., Conforti, P. A., Lupano, C. E. (2014). The role of lipid oxidation on biscuit texture during storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(8), 1925-1931. https://doi.org/10.1111/ijfs.12550
27. Payan, R. (2006). Introduction to Technology of Cereal Products. Aige Pub. Iran.
28. Ravaghi, M., Mazaheri Tehrani, M., Asodeh, A. (2010). Evaluation of performance characteristics of four types of soy flour produced in Iran. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 6(3), 223-228.

29. Sarangapani, C., Devi, Y., Thirundas, R., Annapure, U. S., Deshmukh, R. R. (2015). Effect of low-pressure plasma on physico-chemical properties of parboiled rice. *LWT-food Science and Technology*, 63(1), 452- 460. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.026
30. Segat, A., Misra, N. N., Fabbro, A., Buchini, F., Lippe, G., Cullen, P. J., Innocente, N. (2014). Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. *Food Research International*, 66, 365-372. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.002
31. Segat, A., Misra, N. N., Cullen, P. J. Innocente, N. (2015). Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of whey protein isolate model solution, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 247-254. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.014
32. Shahmiri, A., Seyedin Ardabili, S. M., Hosseini, S. A., Aghagholi zadeh, R. (2016). Effect of storage conditions on physicochemical and pharynographic properties of wheat flour. *Food Science and Technology*, 13(51), 89-102.
33. Sheikholeslami, Z., Mortazavi, S. A., Pourazarang, H., Nasiri, M. (2009). Effect of guar gum and ascorbic acid on rheological and baking properties of insect damaged wheat flour. *Electronic Journal of Food Processing and Preservation*, 1(3), 65-82.
34. Sheikholeslami, Z., Mortazavi, S. A., Pourazarang, H., Nasiri, M. (2010). The effect of ultrasound on Dough rheological properties and bread characteristics of wheat damaged by wheat bug. *Food Science and Technology*, 7(2), 39-49.
35. Singh, N., & Kaur, L. (2004). Morphological, thermal, rheological and retrogradation properties of potato starch fractions varying in granule size. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(10), 1241-1252. https://doi.org/10.1002/jsfa.1746
36. Sui, Z., Yao, T., Zhong, J., Li, Y., Kong, X., Ai, L. (2016). Ozonation treatment improves properties of wheat flour and the baking quality of cake. Philippine Agricultural Scientist, 99(1).
37. Thirumdas, R., Deshmukh, R. R., Annapure, U. S. (2015). Effect of low temperature plasma processing on physicochemical properties and cooking quality of basmati rice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 83-90. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.08.003
38. Thirumdas, R., Deshmukh, R. R., Annapure, U. S. (2016). Effect of low temperature plasma on the functional properties of basmati rice flour. *Journal of food science and technology*, 53(6), 2742-2751. https://doi.org/10.1007/s13197-016-2246-4
39. Thirumdas, R., Saragapani, C., Ajinkya, M. T., Deshmukh, R. R., Annapure, U. S. (2016). Influence of low pressure cold plasma on cooking and textural properties of brown rice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 53-60. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.009
40. Zare Bahnamiri, Z., Motamedzadegan, A., Naqhavi, M., Hamzeh, SH. (2016). The effect of conveying of flour on the qualitative indicators of wheat flour. Conference on Science & Technology of Cereals, Bread & Flour Products.
41. Zhang, B., Xiong, S., Li, X., Li, L., Xie, F. and Chen, L., (2014). Effect of oxygen glow plasma on supramolecular and molecular structures of starch and related mechanism. *Food Hydrocolloids*, 37, pp.69-76. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.034.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 343- 365

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۶۵-۳۴۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Investigation of the synergistic and antagonistic properties of *Spirulina platensis* and *Moringa oleifera* extracts on virgin olive oil

Sanaz Fallah-Taftizadeh[1], Gholamreza Abdi[2], Fatemeh Zendeboodi[3*], Mahdi Mohammadi[2]

Received: 2020.10.05
Accepted: 2020.12.28

How to cite this article:
Fallah-Taftizadeh, S., Abdi, Gh. R., Zendeboodi, F., Mohammadi, M. (2022). Investigation of the synergistic and antagonistic properties of *Spirulina platensis* and *Moringa oleifera* extracts on virgin olive oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 343-365.

Abstract

Introduction: Virgin olive oil has high oxidative stability due to its special compounds, including large amounts of monounsaturated fatty acids (MUFAs) and a wide range of natural antioxidants. However, virgin olive oil is easily oxidized due to the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), mainly linoleic and linolenic acids. Lipid oxidation is the main cause of poor food quality; for this reason, the use of antioxidants is essential to prevent the onset and progression of oxidative damage and increase the shelf life of oils and fats. Because lipid oxidation occurs following a complex set of processes and no antioxidant alone can stop all the oxidation steps and keep oxygen away, a mixture of antioxidants can be used to create a synergistic effect. *Spirulina* is a dry biomass of *Artrhrospira platensis* cyanobacteria. Flavonoids, β-carotene, vitamin A and α- -tocopherol in *spirulina* are largely involved in the high antioxidant activity of this microalgae. The *Moringa oleifera* plant belongs to the *Moringaceae* family, the genus *Moringa* and the species *Oleifera*. This plant is considered as a high-potency natural antioxidant because it is rich in tocopherols, carotenoids, vitamin C, flavonoids and phenolic compounds. Therefore, the aim of this study was to investigate the synergistic and symbiotic effect of *spirulina* and *M. oleifera* extracts as natural antioxidants to increase the oxidation stability and shelf life of virgin olive oil.

Materials and Methods: To prepare the extracts of *s. platensis* and *M. oleifera* plant, both plants were dried in the shade at 30°C for 24 hours in the presence of air, then ground into a powder. Then, 5 g of *s. platensis* and *M. oleifera* powders were extracted with two solvent of ethanol (96%) and methanol. Antioxidant activity was evaluated by measuring the effect of free radical scavenging of ethanolic extracts of Algae Spirulina and Acacia on the synthetic radical DPPH. Determination of total phenol and flavonoid content of all extracts was performed using Folin-Ciocalteu reagent and aluminum chloride colorimetric method, respectively. Polyphenolic compounds of the extracts were identified by HPLC. Extracts were added separately (1000 ppm each) and in combination (500 ppm each) to 100g of virgin olive oil and a sample containing the synthetic antioxidant TBHQ and a sample of virgin olive oil were considered as control. Peroxide index, refractive index and color evaluation (L*, a*, b*) of virgin olive oil samples were measured. Statistical analysis was performed using SPSS software version 19 and the results were expressed as mean ± standard deviation.

Results and Discussion: Based on the results obtained from ethanolic and methanolic *s. platensis* extracts, the highest amount of total phenol in ethanolic extract was equal to 67.19±4.5 mg GA/g and the highest amount of flavonoids in methanolic extract was equal to 12/1±40/267 mg QU/g. In the study of the content of total phenol and

1. Former M.sc Student, Department of Food Science and Technology, Kherad Institute of Higher Education, Bushehr, Iran.
2. Department of Biotechnology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, 7516913817, Iran.
3. Postdoctoral researcher in food science and industry, National Nutrition Food Technology & Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: fzendeboodi@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.40174.0

flavonoids in ethanolic and methanolic extracts of *M. oleifera* plant, there was the highest levels of total phenols and flavonoids in ethanolic extracts of this plant, respectively, 43.43±0.71 mg GA/g and 23.78±1.57 mg QU/g. The results showed that the active compounds in the extracts of *S. platensis* and *M. oleifera* are polyphenolic compounds of rosmarinic acid, catechin, quercetin, vanillin, hesperidin, hesperetin. Changes in peroxide value from the time of production and addition of the extract for 8 hours at 2 hour intervals were investigated. According to the results, the lowest amount of peroxide value (0.38±0.005 meq O_2/kg) was related to the sample containing *M. oleifera* extract at the third storage time. The highest amount of peroxide value was observed in the control and the sample containing TBHQ in the range of 15 meq O_2/kg. Generally, Changes in peroxide value were reduced significantly in the 3 samples containing the extract compared to the control sample and the sample containing TBHQ ($p<0.05$). The presence of extracts in virgin olive oil reduced the parameters of L*a*b*, but the sample containing *S. platensis* extract was no significant difference from the control sample ($p >0.05$). According to the results of peroxide index of samples containing extracts, it can be stated that by recognizing the antioxidant effects of *S. platensis* and *M. oleifera* extract, they can be used for industrial use and replacement with synthetic antioxidants.

Keywords: Virgin olive oil, *Spirulina platensis*, *Moringa oleifera*, Synergitic, Antagonistic, Antioxidant.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 343- 365

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۶۵-۳۴۳

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی خصوصیات هم‌افزایی و هم‌ستیزی عصاره جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ در روغن زیتون بکر

ساناز فلاح تفتی‌زاده[۱]- غلامرضا عبدی[۲]- فاطمه زنده بودی[۳*]- مهدی محمدی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۸

چکیده

اکسیداسیون چربی‌ها باعث تغییر در صفات کیفی روغن‌های گیاهی از جمله روغن زیتون بکر می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی برای حفظ روغن استفاده شده‌اند. با این‌حال، علاقه به جایگزینی آن‌ها با مواد طبیعی وجود دارد. *جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس* (*Spirulina platensis*) و *گیاه گازرخ* (*Moringa Oleifera*) به دلیل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها شناخته شده‌اند. این مطالعه به‌منظور تعیین پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر حاوی عصاره جلبک *اسپیرولینا* و گیاه *گازرخ* صورت گرفت. بدین منظور، عصاره اتانولی *اسپیرولینا* و *گازرخ* تهیه گردید. میزان ppm ۱۰۰۰ از هر یک از عصاره‌ها به‌صورت جداگانه و ppm ۱۰۰۰به‌صورت ترکیب آن‌ها (با نسبت مساوی) به ۱۰۰ گرم روغن زیتون بکر اضافه شد و یک نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ (Tert-Butylhydroquinone) و یک نمونه روغن زیتون بکر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ترکیبات پلی‌فنولیک عصاره‌ها توسط HPLC شناسایی شدند. اندیس پراکسید، ضریب شکست و ارزیابی رنگ (L*، a*، b*) نمونه‌های روغن زیتون بکر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که ترکیبات مؤثره در عصاره‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه *گازرخ*، ترکیبات پلی‌فنولی رزمارینیک اسید، کاتچین، کوئرستین، وانیلین، هسپریدین، هسپرتین است. شاخص پراکسید روغن زیتون در ۳ تیمار حاوی عصاره‌های طبیعی کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ داشت ($p < ۰/۰۵$). وجود عصاره‌های طبیعی در روغن زیتون بکر باعث کاهش ویژگی‌های رنگی (L*، a*، b*) شد ولی با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > ۰/۰۵$). با توجه به نتایج شاخص پراکسید نمونه‌های حاوی عصاره می‌توان بیان کرد که با شناخت اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه *گازرخ* می‌توان از آن‌ها برای استفاده صنعتی و جایگزینی با آنتی‌اکسیدان-های مصنوعی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: روغن زیتون بکر، *اسپیرولینا پلاتنسیس*، گیاه *گازرخ*، هم‌افزایی، هم‌ستیزی، آنتی‌اکسیدان.

مقدمه

روغن‌ها و چربی‌ها تأمین بخش قابل توجه انرژی مورد نیاز بدن، اسیدهای چرب ضروری و ویتامین‌های محلول در چربی را بر عهده دارند. روغن زیتون بکر (VOO[5])، روغنی است که از استحصال روغن از میوه‌های زیتون سالم با استفاده از روش‌های مکانیکی در دمای پایین تولید می‌شود. بخش اعظم روغن زیتون در مناطق مدیترانه‌ای تولید و مصرف می‌شود، اما روغن زیتون بکر به‌دلیل خواص عالی ارگانولپتیکی و مواد مغذی عالی، در سراسر جهان رواج دارد (Servili et al., 2014). روغن زیتون از بخش‌های قابل صابونی شدن و غیرصابونی تشکیل شده است. بخش صابونی عمدتاً از اسیدهای چرب تشکیل شده است، در حالی که بخش غیرصابونی دارای یک مجموعه پیچیده ناهمگن از ترکیبات جزئی است (Servili et al., 2014). اجزای شیمیایی مختلف در این مجموعه ناهمگن شامل آلفاتیک و تری‌ترپنیک الکل‌ها، استرول‌ها، هیدروکربن‌ها، فنول‌ها، توکوفرول‌ها، استرها، رنگدانه‌ها و ترکیبات فرار هستند (Rallo et al., 2018). ترکیبات فنولیک نقش مهمی در ارزش غذایی و خواص ارگانولپتیکی روغن زیتون بکر دارند و این ترکیبات به ماندگاری محصول کمک

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، مؤسسه آموزش عالی خرد، بوشهر، ایران.
۲- استادیار، گروه زیست فناوری، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، ۷۵۱۶، بوشهر، ایران.
۳- پژوهشگر پسادکتری علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و علوم صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

(*- نویسنده مسئول: Email: fzendeboodi@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.40174.0
5 Virgin Olive Oil

می‌کنند و پایداری اکسیداتیو آن را بهبود می‌بخشد (Piroddi et al., 2017; Silva et al., 2010).

روغن زیتون بکر به دلیل ترکیبات خاص خود از جمله مقادیر زیادی اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFAs[1]) و طیف وسیعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، از پایداری اکسیداتیو بالایی برخوردار است (Frankel, 2010). با این وجود، روغن زیتون بکر به‌دلیل وجود اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFAs[2])، عمدتاً اسیدهای لینولئیک و لینولنیک، به راحتی اکسید می‌شود (Morales & Przybylski, 2013). اکسیداسیون روغن زیتون بکر منجر به تشکیل ترکیبات مختلفی مانند رادیکال‌های آزاد، هیدروپراکسی‌ها و محصولات اکسیداسیون تخریب شده مضر می‌شود، که با تغییر رنگ، بوی تند و کاهش کیفیت روغن زیتون بکر همراه است (Frankel, 2010). اکسیداسیون لیپیدها، علت اصلی افت کیفیت ماده غذایی است؛ به همین دلیل، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از آغاز و پیشرفت فساد اکسیداتیو افزایش عمر نگهداری روغن‌ها و چربی‌ها ضروری است (O'brien, 2008).

مطالعات متعددی، تأثیرگذاری آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مختلف را بر پایداری اکسیداتیو روغن‌های غذایی، بررسی کرده‌اند. آلفا، گاما و دلتاتوکوفرول‌ها در روغن‌های گیاهی وجود دارد و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اصلی در روغن‌ها هستند (Hraš et al., 2000). از آنجا که اکسیداسیون لیپیدها به دنبال مجموعه‌ای پیچیده از فرآیندها رخ می‌دهد و هیچ آنتی‌اکسیدانی به تنهایی قادر به جلوگیری از همه مراحل اکسیداسیون و دور نگه داشتن اکسیژن نیست، می‌توان از مخلوط آنتی‌اکسیدان‌ها برای ایجاد یک تأثیر هم‌افزایی (سینرژیستی[3]) استفاده کرد (Hraš et al., 2000).

اسپیرولینا، زیست توده خشک سیانوباکتری *آرتروسپیرا پلاتنسیس* (*Artrhrospira platensis*) می‌باشد (Belay, 2008). *اسپیرولینا* غنی از پروتئین، رنگدانه (شامل کلروفیل، میکسوزانتوفیل، بتا-کاروتن، زی‌زانتین و زانتوفیل)، کربوهیدرات، مقدار نسبتاً بالایی از سیانوکوبالامین (ویتامین B12)، مواد معدنی و سوپراکسید دیسموتاز است. سوپراکسید دیسموتاز مهار کننده رادیکال آزاد است (Cohen, 1997). فلاوونوئید، بتا-کاروتن، ویتامین A و آلفا توکوفرول موجود در اسپیرولینا تا حد زیادی در فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی حاصل از این ریز جلبک شرکت می‌کنند (Wang et al., 2007). گزارش شده که عصاره *اسپیرولینا* به‌عنوان آنتی‌اکسیدانی قابل دسترس و ایمن، می‌تواند جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی باشد (Mendiola et al., 2007).

گیاه *گازرخ* متعلق به خانواده *مورینگاسه* (*Moringaceae*)، جنس *مورینگا* (*Moringa*) و گونه *اولیفرا* (*Oleifera*) است. این گیاه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی با قدرت بالا محسوب می‌شود زیرا سرشار از توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها، ویتامین C، فلاوونوئیدها و ترکیبات فنولیک است (Iqbal & Bhanger,2008). فلاوونوئیدها با مهار رادیکال‌های اکسیژن با داشتن فعالیت‌های ضدسرطان، ضدپیری و ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان‌های بسیار مؤثری هستند (Braca et al., 2002). مطالعات متعددی در زمینه عصاره جلبک *اسپیرولینا* و گیاه *گازرخ* برروی روغن‌های خوراکی و پایداری اکسیداتیو آن‌ها صورت گرفته است؛ از جمله مطالعه Morsy و همکاران (۲۰۱۹) در تقویت پایداری اکسیداتیو و ویژگی‌های کیفیت روغن زیتون با استفاده از نانوذرات *اسپیرولینا* (*Arthrospira platensis*) است که نتایج آن‌ها تأیید کرد وجود Sp-NPsها در مهار اکسیداسیون، بهبود رنگ روغن و افزایش ماندگاری تا ۴۷۵ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد مؤثر هستند (Morsy et al., 2019). در مطالعه‌ای دیگر از Rasika (۲۰۱۳) فعالیت ضدمیکروبی *مورینگا اولیفرا* و هم‌افزایی آن با کنجد وحشی (*Cleome viscosa*) مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که ترکیبی از کنجد وحشی و *مورینگا اولیفرا* اثر هم‌افزایی قوی نسبت به *کلبسیلا پنومونیه*، *اشریشیا کلی*، *استرپتوکوک پنومونیه* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* دارند (Rasika, 2013). از این‌رو، هدف از این پژوهش، بررسی اثر هم‌افزایی و هم‌ستیزی عصاره ریزجلبک *اسپیرولینا* و گیاه *گازرخ* به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت افزایش پایداری اکسیداسیون و زمان ماندگاری روغن زیتون بکر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روغن زیتون فرابکر تجاری از فروشگاه زنجیره‌ای شهرستان شیراز خریداری شد که مشخصات کامل آن در جدول ۱ ارائه شده است. برگ گیاه *گازرخ* و جلبک *اسپیرولینا* از پژوهشکده کشاورزی دانشگاه خلیج فارس بوشهر تهیه گردید و قبل از عصاره‌گیری مورد آنالیز قرار گرفت که نتایج در جدول ۲ گزارش شده ست. آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ[4] (Camlin، هندوستان) استفاده گردید. تیوسولفات سدیم، نشاسته، پتاسیم یدید، استیک‌اسید، کلروفرم (Merck، آلمان) مورد استفاده قرار گرفت.

1 MonoUnsaturated Fatty Acids
2 PolyUnsaturated Fatty Acids
3 synergistic
4 Tert-Butylhydroquinone

تهیه و استخراج عصاره از جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ

سلول‌های کشت داده شده جلبک اسپیرولینا برداشت و سپس شستشو شدند. سپس اسپیرولینای شسته شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در سایه خشک شد، محصول ورقه‌ای به‌دست آمده جمع‌آوری شد و با آسیاب، به پودر اسپیرولینا تبدیل شد (Choonawala, 2007). همچنین خشک کردن برگ گیاه گازرخ در سایه و در مجاورت هوا با دمای حدود ۳۰ درجه سلسیوس خشک گردید و سپس به پودر تبدیل شد.

عصاره‌گیری جلبک اسپیرولینا و برگ گیاه گازرخ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس انجام گرفت. برای تهیه عصاره، ۵ گرم از پودر جلبک اسپیرولینا و پودر برگ گیاه گازرخ با ۵۰ میلی‌لیتر اتانول غلیظ (۹۶ درصد) هر کدام در یک بشر جداگانه توسط همزن مغناطیسی مخلوط شد و پس از درپوش‌گذاری ظروف با فویل، به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس برای شفاف‌سازی عصاره از سانتریفوژ با دور g. ۹۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس استفاده گردید. لایه رویی عصاره به آرامی برداشته شد، عصاره استخراج شده با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) صاف گردید. سپس عصاره تهیه شده توسط آون (Memmert، ULM-500، آلمان) در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، حلال باقی مانده حذف گردید؛ در انتها پس از حذف حلال بصورت کامل، عصاره‌ها تا انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Fayyad et al., 2019).

جدول ۱- مشخصات نمونه روغن زیتون فرابکر قبل از انجام تیمار

Table 1- Specifications of extra virgin olive oil before treatment

Parameters پارامترها	Results نتایج
Salt (g) نمک (گرم)	0
Trans fatty acids (g) اسیدهای چرب ترانس (گرم)	0
Peroxide (meq O_2/kg) پراکسید (meq O_2/kg)	9.48
Refractive index ضریب شکست	1.4677

جدول ۲- نتایج ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی جلبک اسپیرولینا و برگ گیاه گازرخ قبل از عصاره‌گیری

Table 2– Results of physicochemical properties of spirulina algae and leaves of *Moringa oleifera* before extraction

Parameters پارامترها	Spirulina algae powder پودر جلبک اسپیرولینا	*M.oleifera leaf* plant powder پودر برگ گیاه گازرخ
Energy (K) انرژی (کالری)	120	205
Sugar (g) قند (گرم)	10	--
Fat (g) چربی (گرم)	0	2.3
Carbohydrates (g) کربوهیدرات (گرم)	27	38.2
Fiber (g) فیبر (گرم)	1	19.2
Protein (g) پروتئین (گرم)	2	27.1

آماده‌سازی نمونه روغن زیتون بکر حاوی عصاره گیاهی و شرایط نگهداری آن

پس از تهیه روغن زیتون بکر، جهت انجام این مطالعه طبق جدول ۳ مقادیر مشخص از عصاره جلبک اسپیرولینا و عصاره برگ گیاه گازرخ به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی به ۱۰۰ گرم روغن زیتون بکر اضافه شد. لازم به ذکر است که عصاره‌های اضافه شده به روغن زیتون به راحتی حل شده و این امر می‌تواند به دلیل حلال مورد استفاده (اتانول) در عصاره‌گیری مربوط باشد. جهت مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، یک نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ تهیه شد (جدول ۳). نمونه عاری از عصاره‌های طبیعی و آنتی‌اکسیدان مصنوعی، به‌عنوان تیمار شاهد تعیین شد. بعد از آماده کردن نمونه‌های روغن زیتون بکر، اثر تیمارهای به‌کار رفته بر شدت اکسایش روغن زیتون در شرایط اکسایش تسریع شونده طی نگهداری در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۸ ساعت و در فواصل زمانی ثابت دو ساعته از طریق سنجش شاخص پراکسید، ضریب شکست و رنگ روغن بررسی گردید (Singh et al., 2006).

جدول ۳- نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه

Table 3- The samples studied in the research

Treatment تیمار	Antioxidant content (ppm) میزان آنتی‌اکسیدان (ppm)	Composition of samples ترکیب نمونه‌ها
VOO	-	Virgin olive oil روغن زیتون بکر
VOO+ S.p	1000	Virgin olive oil+ spirulina extract روغن زیتون بکر+عصاره جلبک اسپیرولینا
VOO+ M.o	1000	Virgin olive oil+ M.oleifera extract روغن زیتون بکر+عصاره برگ گیاه گازرخ
VOO+ S.p+ M.o	(500+ 500) 1000	Virgin olive oil+ spirulina extract+ M.oleifera extract روغن زیتون بکر+عصاره جلبک اسپیرولینا+ عصاره برگ گیاه گازرخ
VOO+ TBHQ	1000	Virgin olive oil+ TBHQ روغن زیتون بکر+TBHQ

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی با اندازه‌گیری اثر مهار رادیکال آزاد عصاره‌های اتانولی جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ بر رادیکال سنتزی DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر طبق روش استفاده شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد (Zhang et al., 2007). آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره در رقت‌های مختلف (۶/۲۵ ppm، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۳۲۰۰) را در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته، در خانه‌های جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر رقت‌های مختلف TBHQ به‌عنوان کنترل مثبت ریخته شد، سپس به هر یک از آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول متانولی DPPH اضافه شد. آزمایش در محیط تاریک و دور از نور به کمک فویل انجام گردید زیرا محلول DPPH به نور حساس بوده و باعث شکسته شدن ساختار آن می‌گردد. برای هر رقت عصاره یک نمونه شاهد (عصاره بدون محلول DPPH) در نظر گرفته شد. از ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH و ۱۰۰ میکرولیتر حلال به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس میکروپلیت ۹۶ تایی را درون میکروپلیت ریدر قرار داده تا ۱۰ ثانیه تکان داده و بعد از ۳۰ دقیقه در تاریکی به حالت سکون گذاشته شد و سپس جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهارکنندگی} = (A_{sample} - A_{sample\ blank}) / A_{control}) \times 100 \quad (۱)$$

A_{sample}: جذب نمونه تست (محلول DPPH+ نمونه تست)

$A_{sample\ blank}$: جذب نمونه (نمونه بدون محلول DPPH)

$A_{control}$: جذب نمونه شاهد (محلول DPPH بدون نمونه)

IC50 یا غلظت مورد نیاز عصاره برای مهار ۵۰ درصد رادیکال DPPH با آنالیز رگرسیون خطی غلظت عصاره در برابر درصد مهار محاسبه گردید.

تعیین مقدار فنول کل عصاره‌ها

تعیین فنول تام عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین-سیوکالته و براساس روشZhang و همکاران (۲۰۰۷) انجام گردید. در این روش مقدار کل ترکیبات فنولی براساس یک ترکیب فنولی انتخاب شده، که در اغلب موارد این ترکیب گالیک‌اسید است، بیان می‌گردد و نتیجه آن

به‌صورت میلی‌گرم گالیک‌اسید بیان می‌شود. جهت انجام آزمون، ۱ میلی‌لیتر عصاره به ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالته ۰/۱ مولار هم اضافه گردید و محتویات کاملاً مخلوط شدند. پس از ۱ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر محلول کربنات‌سدیم ۲۰ درصد اضافه و مخلوط کاملاً همزده شد. نمونه شاهد شامل معرف واکنش بدون نمونه بود. نمونه پس از قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه به مدت ۲ ساعت، میزان جذب آن در ۷۵۰ نانومتر قرائت شد و با استفاده از معادله خط منحنی کالیبراسیون گالیک اسید میزان فنول عصاره‌ها براساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک محاسبه گردید (Zhang et al., 2007).

اندازه‌گیری میزان فلاوونوئید کل عصاره‌ها

مقدار فلاوونوئید کل عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلریدآلومینیوم براساس روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) انجام گرفت. جهت انجام آزمون، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند. پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن محلول‌ها در دمای اتاق، میزان جذب واکنش‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Chang et al., 2002). از کوئرستین برای ایجاد منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. بدین جهت مقدار ۱۰ میلی‌گرم کوئرستین در اتانول ۸۰ درصد حل شد و سپس به ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق شد. سپس محلول‌های استاندارد رقیق شده (۰/۵ میلی‌لیتر) به‌طور جداگانه با ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند و پس از ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها در ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن عصاره بیان گردید. منحنی کالیبراسیون با استفاده از خواندن جذب غلظت‌های مختلف کوئرستین به‌دست آمد (Chang et al., 2002).

ارزیابی ترکیبات عصاره‌ها با HPLC

برای جداسازی و تعیین مقدار فنول‌های موجود در عصاره‌های اسپیرولینا پلاتنسیس و گیاه گازرخ از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. سیستم مجهز به ستون Zarbax eclipse (XDB) C18 به طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر که با ذراتی به ابعاد ۵ میکرومتر پرشده و دمای ستون ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. دتکتور استفاده شده Diod array detector با طول موج تهییج ۲۸۰ نانومتر و طول موج نشر ۳۲۰ نانومتر، فاز متحرک شامل دو بخش A (متانول) و B (فرمیک اسید ۱ درصد) طبق جدول ۴ و سرعت جریان برابر ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم هر بار تزریق نمونه برابر با ۲۰ میکرولیتر بود. داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Chemstation software جمع‌بندی شدند.

جدول ٤- برنامه گرادیانی مورد استفاده در اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌فنولیک عصاره‌ها

Table 4- Gradient program used to measure polyphenolic compounds of extracts

Time (min) زمان (دقیقه)	Flow rate (mL.min) سرعت جریان (میلی‌لیتر در دقیقه)	Mobile phase A (methanol) فاز متحرک A (متانول)	Mobile phase B (1% formic acid) فاز متحرک B (فرمیک اسید ۱٪)
Primary time زمان اولیه	1	10	90
10	1	25	75
20	1	60	40
30	1	70	30
40	1	70	30

اندازه‌گیری عدد پراکسید

تعیین عدد پراکسید یکی از متداول‌ترین تست‌هایی است که برای تعیین تندی اکسیداتیو استفاده می‌شود. در این مطالعه اندازه‌گیری عدد پراکسید مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۹ انجام گرفت. برای بررسی اثر ماندگاری، روغن‌ها به مدت ۸ ساعت در شرایط اکسیداسیون تسریع شده (آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس) نگهداری شدند و سپس عدد پراکسید مطابق با روش فوق در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. روش کار بدین صورت بود که ۵ ±۰/۰۵ گرم نمونه روغن توسط ترازو (دقت ۰/۰۱ گرم، Sartorius، TE412، آلمان) آماده شده در ارلن مایر سر سمباده‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری وزن شده و ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط استیک اسید و کلروفرم (نسبت ۳ به ۲) به آن افزوده و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر یدید پتاسیم اشباع اضافه گردید. محلول به دست آمده را به مدت ۱ دقیقه بدون همزدن گذاشته، سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده و چند قطره چسب نشاسته به آن افزوده که یک رنگ آبی در محلول ایجاد کرد، سپس با تیوسولفات سدیم ۰/۲ نرمال تا از بین رفتن رنگ آبی عیارسنجی ادامه داشت و در آخر عدد پراکسید مطابق رابطه ۲ محاسبه گردید (Iran, 2018):

$$PV= [(S - B) \times N \times 1000]/ M \quad (۲)$$

که در آن:

PV: عدد پراکسید بر حسب میلی اکی‌والان در ۱۰۰۰ گرم نمونه روغن.

S: میلی‌لیتر تیوسولفات سدیم استفاده شده برای نمونه روغن.

B: میلی‌لیتر تیوسولفات سدیم استفاده شده برای نمونه شاهد.

N: نرمالیته محلول تیوسولفات سدیم.

M: وزن روغن بر حسب گرم.

اندازه‌گیری ضریب شکست

ضریب شکست یک ماده نسبت سرعت نور با طول موج معین در خلاء به سرعت نور در آن ماده است. جهت اندازه‌گیری ضریب شکست روغن از روش استاندارد ملی ایران به شماره ۵۱۰۸ استفاده گردید. قبل از اندازه‌گیری ضریب شکست، قسمت منشور دستگاه رفراکتومتر (Atago، RX5000، ژاپن) با یک پارچه نرم و سپس با یک پنبه مرطوب شده با چند قطره استون تمیز کرده و اجازه داده شد تا خشک شود. سپس بعد از استاندارد کردن دستگاه رفراکتومتر توسط آب مقطر، یک یا دو قطره نمونه روغن برروی منشور دستگاه ریخته و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ضریب شکست نمونه تعیین گردید (Iran, 2011).

ارزیابی رنگ نمونه‌های روغن زیتون بکر (L*,a*,b*)

رنگ به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی و خاصیت در آگاهی از کیفیت محصول شناخته شده است و مصرف‌کنندگان از آن به‌عنوان نشانه‌ای برای پذیرش یا عدم‌پذیرش موادغذایی استفاده می‌کنند. جهت اندازه‌گیری رنگ نمونه‌ها با روش L*a*b* بر اساس روش Afshari Jouybari و Farahnaky (۲۰۱۱) انجام گردید. جهت انجام این آزمون توسط رنگ‌سنج (Monilta، CR-400، ژاپن) نمونه‌های روغن را به مقدار مساوی در ظرف‌های مسطح کوچک شیشه‌ای مشابه از لحاظ جنس، ارتفاع و قطر ریخته و در محیط بسته سفید رنگی توسط دوربین عکس‌برداری شدند. سپس پارامترهای رنگی نمونه L* (معیار روشنایی–سیاهی از ۰ (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید))، a* (رنگ سبز تا قرمز، +a* (رنگ قرمز) و –a* (رنگ سبز)) و b* (رنگ آبی تا زرد، +b* (رنگ زرد) و –b* (رنگ آبی)) با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ تعیین شدند، سپس اختلاف رنگ نمونه‌های حاوی عصاره یا TBHQ با نمونه شاهد با استفاده از رابطه ۳ به‌دست آمد (Afshari-Jouybari & Farahnaky, 2011).

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (۳)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این مطالعه کلیه آزمون‌ها حداقل در ۲ تکرار انجام شد و در کاربرد عصاره‌ها برروی روغن زیتون بکر از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام و نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شدند. تفاوت بین میانگین داده‌ها توسط آنالیز واریانس یکطرفه One way-ANOVA انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها، از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ ($p<۰/۰۵$) استفاده گردید.

نتایج و بحث

خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار ترکیبات فنولیک کل و فلاوونوئید در عصاره‌های متانولی و اتانولی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه گازرخ در جدول‌های ۵ و ۶ ارائه شده است. IC50 نشان‌دهنده مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس گالیک اسید است. معمولاً نتایج آزمون DPPH براساس IC50 بیان می‌گردد. IC50 بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰ درصد بازدارندگی در ظرفیت رادیکالی می‌شود و مقدار آن از طریق رسم منحنی کالیبراسیون بر حسب غلظت‌های مختلف نمونه و محاسبه معادله خط رگرسیون به‌دست می‌آید (Khalighi-Sigaroodi et al., 2012) (شکل ۱).

شکل‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب، منحنی استاندارد ترکیبات فنولیک براساس گالیک اسید و فلاوونوئید براساس کوئرستین در عصاره‌های متانولی و اتانولی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده مطابق جدول ۵ بیش‌ترین میزان فنول کل در عصاره اتانولی اسپیرولینا برابر با ۴/۵۷ mg GA/g Sp ±۶۷/۱۹ و بیش‌ترین میزان فلاوونوئید در عصاره متانولی اسپیرولینا با مقدار mg QU/g Sp ۱/۱۲ ±۲۶۷/۴۰ است. در بررسی میزان محتوای فنول کل و فلاوونوئید در عصاره اتانولی و متانولی گیاه *گازرخ* مطابق با جدول ۶، بیش‌ترین میزان فنول کل و فلاوونوئید در عصاره اتانولی این گیاه، به‌ترتیب ۰/۷۱ ±۴۳/۴۳ و ۱/۵۷ mg QU/g Mo ±۲۳/۷۸ وجود داشت. همچنین بر اساس بررسی‌های انجام شده جهت خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ، بیش‌ترین IC50 در عصاره اتانولی گیاه *گازرخ* (۱۴۶۹۸۲ mg/ml) وجود داشت و این امر نشان می‌دهد که عصاره گیاه گازرخ دارای بیش‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به عصاره جلبک اسپیرولینا است.

جدول ۵- خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و اتانولی اسپیرولینا

Table 5- Antioxidant properties of methanolic and ethanolic extracts of Spirulina

Abundance فراوانی	Antioxidant properties خصوصیات آنتی‌اکسیدانی
	Methanolic extract of *Spirulina platensis* **عصاره متانولی *اسپیرولینا پلاتنسیس***
--	**IC50 (mg/ml)** **IC50 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)**
32.35± 1.23	**Total phenol* (mg GA/g of spirulina)** **فنول کل* (میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم اسپیرولینا)**
267.4± 1.12	**Total Flavonoid* (mg QE/g of spirulina)** **فلاوونوئید کل* (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم اسپیرولینا)**
	Ethanolic extract of *Spirulina platensis* **عصاره اتانولی *اسپیرولینا پلاتنسیس***
8452.75	**IC50 (mg/ml)** **IC50 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)**
67.19± 4.57	**Total phenol* (mg GA/g of spirulina)** **فنول کل* (میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم اسپیرولینا)**
103.06± 4.91	**Total Flavonoid* (mg QE/g of spirulina)** **فلاوونوئید کل* (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم اسپیرولینا)**

* داده‌ها بر حسب (میانگین ± انحراف معیار) در دو تکرار گزارش شده است.

* Data were reported in terms of (mean ± standard deviation) in two replications.

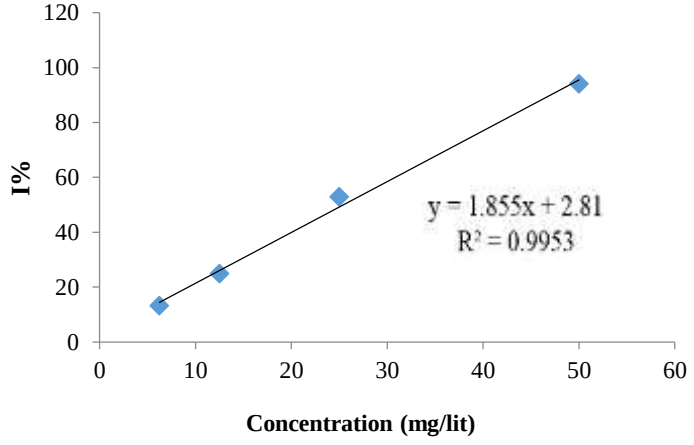
جدول ٦- خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و اتانولی گیاه گازرخ (*Moringa oleifera*)

Table 6- Antioxidant properties of methanolic and ethanolic extracts of *Moringa oleifera*

Abundance فراوانی	Antioxidant properties خصوصیات آنتی‌اکسیدانی
	Methanolic extract of *Moringa oleifera* **عصاره متانولی گیاه *گازرخ***
--	**IC50 (mg/ml)** **IC50 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)**
36.48± 0.08	**Total phenol* (mg GA/g of M.oleifera)** **فنول کل* (میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم گازرخ)**
14.17± 0.07	**Total Flavonoid* (mg QE/g of M.oleifera)** **فلاوونوئید کل* (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم گازرخ)**
	Ethanolic extract of *Moringa oleifera* **عصاره اتانولی گیاه *گازرخ***
146982	**IC50 (mg/ml)** **IC50 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)**
43.43± 0.71	**Total phenol* (mg GA/g of M.oleifera)** **فنول کل* (میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم گازرخ)**
23.78± 1.57	**Total Flavonoid* (mg QE/g of M.oleifera)** **فلاوونوئید کل* (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم گازرخ)**

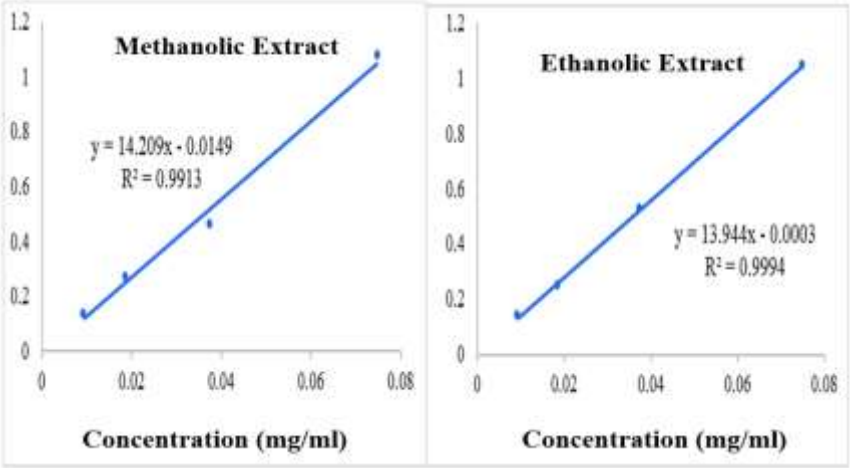
* داده‌ها بر حسب (میانگین ± انحراف معیار) در دو تکرار گزارش شده است.

* Data were reported in terms of (mean ± standard deviation) in two replications



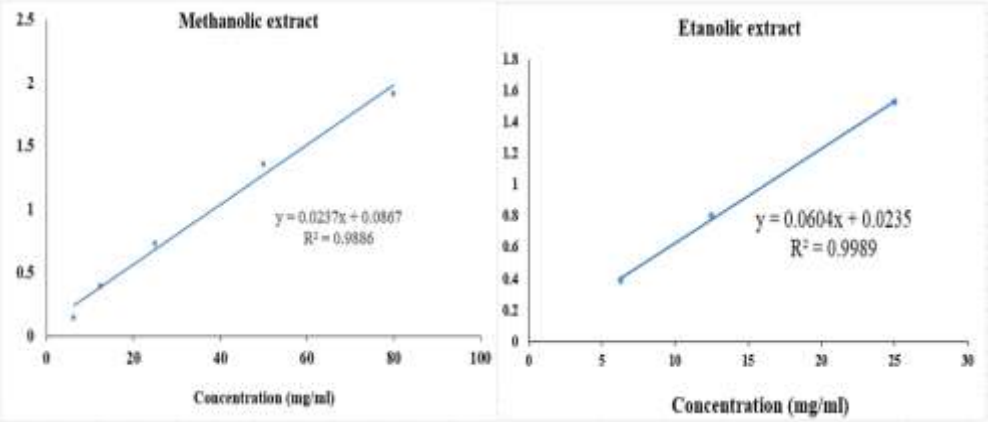
شکل ۱- منحنی استاندارد به روش DPPH (گالیک اسید)

Fig. 1. Standard curve by DPPH method (gallic acid)



شکل ۲- منحنی استاندارد ترکیبات فنولیک کل جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* براساس گالیک اسید

Fig. 2. Standard curve of total phenolic compounds of *spirulina platensis* based on gallic acid



شکل ۳- منحنی استاندارد ترکیبات فلاوونوئیدی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* براساس کوئرستین

Fig. 3. Standard curve of flavonoid compounds of *spirulina platensis* based on quercetin

فعالیت مهار رادیکال DPPH یکی از روش‌های پرکاربرد برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی اسپیرولینا بر اساس روش DPPH باتوجه به روش توصیف شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد. در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با بررسی فعالیت مهارکنندگی ۵۰ درصد رادیکال آزاد عصاره (IC50) انجام شد. IC50، غلظت مورد نیاز عصاره جهت مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد است و پارامتر خوبی جهت مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های مختلف می‌باشد. هرچه خاصیت ضداکسایشی ماده‌ای بیشتر باشد، غلظت مورد نیاز آن ماده جهت مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد کمتر می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف ناشی از توانایی آن‌ها در دادن اتم هیدروژن یا الکترون جهت مهار رادیکال‌های آزاد است (Szabo et al., 2007). باتوجه به نتیجه به‌دست آمده در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی بالایی در عصاره ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* مشاهده شده است. مطالعات متعددی در زمینه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اسپیرولینا صورت گرفته است (Abu Zaid et al., 2015; Dartsch, 2008).

اسپیرولینا پلاتنسیس حاوی کاروتنوئید، ویتامین E، فیکوسیانین و کلروفیل است (Abu Zaid et al., 2015). این ترکیبات با داشتن توانایی اهداء هیدروژن در کاهش رادیکال‌های DPPH شناخته شده‌اند (Li et al., 2009). Egea و همکاران (۲۰۱۴) یافتند که افزودن مکمل *اسپیرولینا پلاتنسیس* به کلوچه‌ها باعث افزایش ترکیبات فنولیک کل و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌شود؛ در این مورد آن‌ها از روش‌های مختلفی برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا از جمله روش مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده کردند، آن‌ها متوجه افزایش قابل توجه خواص آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH شدند (Egea et al., 2014).

ترکیبات فنولی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نه تنها در میوه‌ها و سبزیجات بلکه در سیانوباکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (Colla et al., 2007). طبق جدول ۵، زیست توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* مقدار قابل توجهی از ترکیبات فنولی کل (عصاره متانولی ۳۲/۳۵ و عصاره اتانولی ۶۷/۱۹ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره) را نشان داد. مطابق با نتایج بیش‌ترین میزان ترکیبات فنولی (۶۷/۱۹ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره) در عصاره اتانولی به ازای ۵ گرم عصاره تعیین شده است. مطالعات متعددی مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر وجود دارد؛ Abu Zaid و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که محتوای ترکیبات فنولی در اسپیرولینا تهیه شده بین ۴۰/۴۵- ۲۶/۷۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم بوده است (Abu Zaid et al., 2015). Sahu و همکاران (۲۰۱۳) ارتباط معنی‌داری بین محتوای فنولی و مهار رادیکال DPPH در همه سبزیجات برگ‌دار مورد بررسی، نشان داد ($p < ۰/۰۵$؛ $r = ۰/۹۹۳$)؛ آن‌ها در این مورد اظهار داشتند که این امر نشان می‌دهد ظرفیت مهار رادیکال هر عصاره ممکن است به غلظت گروه‌های هیدروکسی فنولی مربوط باشد، آن‌ها دریافتند که بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از پلی‌فنول‌ها به میزان قابل توجهی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارند و به‌عنوان مهارکننده‌های رادیکال آزاد بسیار مؤثر عمل می‌کنند که عمدتاً به دلیل ویژگی‌های ردوکس آن‌ها است که می‌توانند نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، غیرفعال کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه یا تجزیه پراکسیدها داشته باشند.

ترکیبات فلاوونوئید و فنولیکی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط گیاهان در پاسخ به شرایط سخت محیطی تولید می‌شوند. محققان زیادی از مزایای گیاه گازرخ گزارش داده‌اند؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Karageorgou et al., Lalas & Tsaknis, 2002; Iqbal & Bhanger, 2006; 2017)، فلاوونوئیدهای زیست فعال (Lin et al., 2018)، ضددیابتی (Bamagous et al., 2018)، ضدباکتریایی (Guillen-Roman et al., 2018) و ضدسرطان (Cuellar-Nunez et al., 2018) گزارش شده است.

مقدار کل فلاوونوئید در عصاره اتانولی در مطالعه حاضر ۲۳/۷۸ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم نمونه بود در چندین مطالعه، مقدار فلاوونوئید در عصاره گیاه گازرخ؛ ۹۰ mg/g QE (Xiang et al., 2017)، حدود ۸۰ mg/g QE (Cuellar-Nunez et al., 2018)، و ۲۷ mg/g QE (Sreelatha & Padma, 2009) گزارش شده است. مقدار فنول کل در عصاره اتانولی گیاه گازرخ در این مطالعه ۴۳/۴۳ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم نمونه بود که در مطالعات دیگر میزان فنولیک عصاره این گیاه حدود ۲۰۰۰ mg/g GAE (Xiang et al., 2017)، ۹۰۰ mg/g GAE (Cuellar-Nunez et al., 2018)، ۱۴۶۰ mg/g GAE (Guillen-Roman et al., 2018) و ۵۲ mg/g GAE (Baldisserotto et al., 2018) ثبت شده است. از آنجا که پلی‌فنول‌ها مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، مقدار به‌دست آمده از کل پلی‌فنول‌های موجود در عصاره گیاه گازرخ نشان می‌دهد که این گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است (Sreelatha & Padma, 2009). عصاره‌های گیاهی و آنتی‌اکسیدان‌های مشتق شده از گیاهان می‌توانند یک تعداد از اثرات داخل بدن مانند ارتقاء افزایش سنتز محافظت آنتی‌اکسیدانی درون‌زا ایجاد کنند یا خود مستقیماً به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کنند (PhD, 1999). همچنین گزارش شده است که ترکیب آنتی‌اکسیدان‌ها با عوامل مختلفی مانند مرحله بلوغ، واریته، شرایط آب و هوایی، بخشی از گیاه

مورد تجزیه و تحلیل، دستکاری پس از برداشت، فرآوری و ذخیره-سازی متفاوت است (Rodriguez-Amaya, 2003).

فیتوشیمیایی‌ها گروهی از مواد شیمیایی هستند که توسط گیاهان از طریق متابولیسم اولیه یا ثانویه تولید می‌شوند و در برابر تهدیدات موقتی یا دائمی محافظت می‌کنند و در رشد و تولیدمثل گیاه نقش دارند (Samanta et al., 2018). باتوجه به ساختار شیمیایی آن‌ها، فیتوشیمیایی‌ها را می‌توان به سه دسته اصلی تقسیم کرد: ترکیبات حاوی نیتروژن/گوگرد، ترپن و فنول‌ها که شامل فلاوونوئیدها و اسیدهای فنولیک، و لیگنین‌ها است (Heneman & Zidenberg-Cherr, 2008). مطالعات زیادی از بخش‌های مختلف گیاه گازرخ در خصوص ترکیبات فیتوشیمیایی صورت گرفته که از بخش‌هایی مانند برگ، ریشه، گل، دانه انجام شده است (Wang et al., Onsare & Arora, 20152017). به‌طور مثال، برگ‌های گیاه گازرخ برداشت شده در آفریقای جنوبی و نامیبیا شامل حداقل ۱۴ فلاوونوئید با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بسیار بالا همراه با طیف‌سنجی جرمی (UHPLC) بود (Makita et al., 2016). در مطالعه حاضر میزان غلظت فنول کل و فلاوونوئید در عصاره متانولی گیاه گازرخ به‌ترتیب ۳۶/۴۸ mg/g GAE و ۱۴/۱۷ mg/g QE بود که در مطالعه Siddhuraju و Becker (۲۰۰۳) میزان غلظت فنولیک کل و فلاوونوئید در عصاره متانولی ۸۰ درصد از نیکاراگوئه به‌ترتیب ۱۲/۳۳ mg/g GAE و ۱۴/۰۷ mg/g QE بود (Siddhuraju & Becker, 2003) که این مقدار با میزان فلاوونوئید مطالعه حاضر همخوانی داشت. نمونه برگ‌های بالغ خشک شده در هند، که با آب (۶۰۰ ml) به مدت ۲۰–۱۸ ساعت عصاره‌گیری شده دارای فنول کل و فلاوونوئید به‌ترتیب ۴/۵۸ mg/g GAE و ۲/۷ mg/g QE بود (Sreelatha & Padma, 2009). این تفاوت در محتوای فلاوونوئیدها و فنول‌ها در برگ‌های گیاه گازرخ ممکن است به دلیل رشد محیط، تنوع ژنتیکی، روش تیمار نمونه و بلوغ برگ باشد. اگرچه هم متانول و هم اتانول می‌توانند غلظت بالاتری از فلاوونوئید و فنولیک را استخراج کنند، از اتانول به‌عنوان یک حلال مؤثر برای استخراج آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود، زیرا متانول خطر محیطی را نشان داده و برای انسان سمی است (M'hiri et al., 2015).

بررسی ترکیبات فنولیک عصاره‌ها

نتایج بررسی ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره‌های جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه گازرخ شامل نوع و درصد ترکیبات شناسایی شده در عصاره‌ها که از بررسی طیف‌های حاصل از تزریق عصاره‌ها به دستگاه HPLC به‌دست آمده است، در جدول ۷ آورده شده است. در شکل‌های ۴ و ۵ کروماتوگرام ترکیبات فنولیک موجود در عصاره‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه گازرخ ارائه شده است. مطالعات متعددی در نقاط مختلف جهان، در رابطه با ترکیبات فنولیک شناسایی شده در جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ گزارش شده است که به‌ترتیب، در جدول ۸ و ۹ خلاصه‌ای از این گزارشات ارائه شده است.

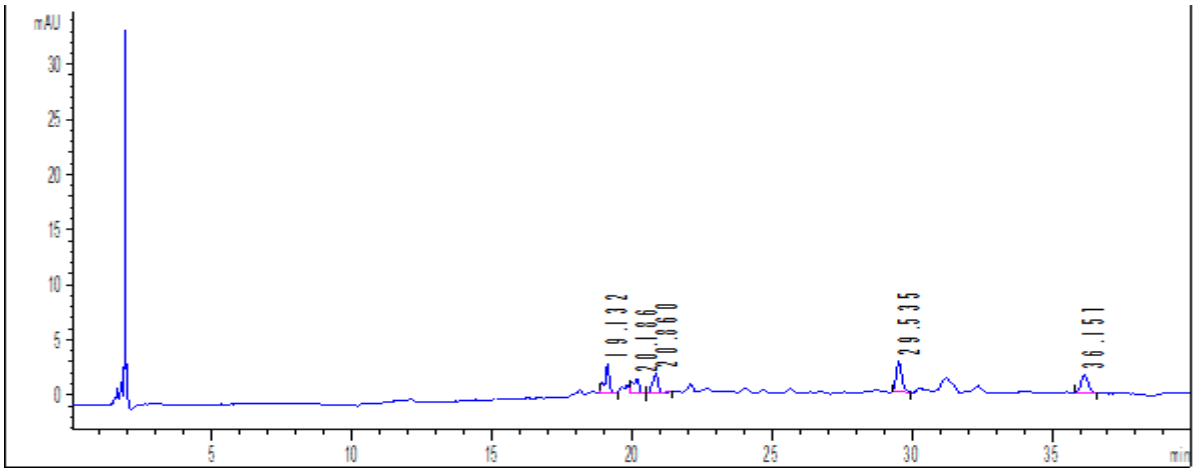
جلبک‌های دریایی یکی از منابع زنده دریایی مهم است و آن‌ها منبع بسیار خوبی از ویتامین‌ها و همچنین مواد معدنی مانند کلسیم، فسفر، سدیم و پتاسیم هستند. فیبرهای غذایی جلبک‌های دریایی مجموعه‌ای از عملکردهای مختلفی مانند آنتی‌اکسیدان، ضدانعقاد، ضدسرطان‌زایی و ضدتومور را انجام می‌دهند (Dhargalkar & Pereira, 2005). گزارش‌ها حاکی از آن است که جلبک دریایی نیز منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است (Kuda et al., 2002). مطالعات متعددی در مورد خصوصیات فیزیولوژیکی برخی از ترکیبات باارزش ضدویروسی و آنتی‌اکسیدانی در جلبک سبز–آبی اسپیرولینا متمرکز شده است (Ozdemir et al., 2004). *اسپیرولینا پلاتنسیس* یا عصاره‌های آن توانایی درمانی مانند جلوگیری از بروز سرطان‌ها، تحریک سیستم ایمنی بدن، کاهش سطح کلسترول خون و فلزات سمی و دفاع در برابر آسیب ناشی از اشعه را نشان داده است (Belay et al., 1993). اسپیرولینا به دلیل ظرفیت تولید بالاتر در مقایسه با منابع معمول مشتق شده از گیاهان، منبع خوبی از ترکیبات مغذی فنولی و فلاوونوئیدی محسوب می‌شود. اسپیرولینا حاوی گروه‌های مختلفی از فلاوونوئیدها مانند ایزوفلاون، فلاونول‌ها و فلاونون‌ها است. این فنول‌های طبیعی طیف گسترده‌ای از خواص شیمیایی و بیولوژیکی از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد را دارند. علاوه براین، مقدار متفاوت محتوای فنولیک کل در عصاره-های مختلف این ریزجلبک را می‌توان به عوامل جغرافیایی، فیزیولوژیکی، فاکتورهای محیطی و شرایط کشت نسبت داد (Kepekçi & Saygideger, 2012). Seghiri و همکاران (Seghiri et al., 2019) در شناسایی و تعیین ترکیبات فنولی، در مجموع ۲۰ ترکیب فنولیک و فلاوونوئید با استفاده از HPLC-DAD/MS از عصاره استخراج شده ریزجلبک *اسپیرولینا* شناسایی کردند. مقدار اسید فنولیک بسته به شرایط کشت در گونه‌های اسپیرولینا متغیر است (Kepekçi & Saygideger, 2012; Pagnussatt et al., 2014).

جدول ۷- نوع و درصد ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره‌های جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ

Table 7- Type and percentage of phenolic compounds identified in *S. platensis* and *M. oleifera* extracts

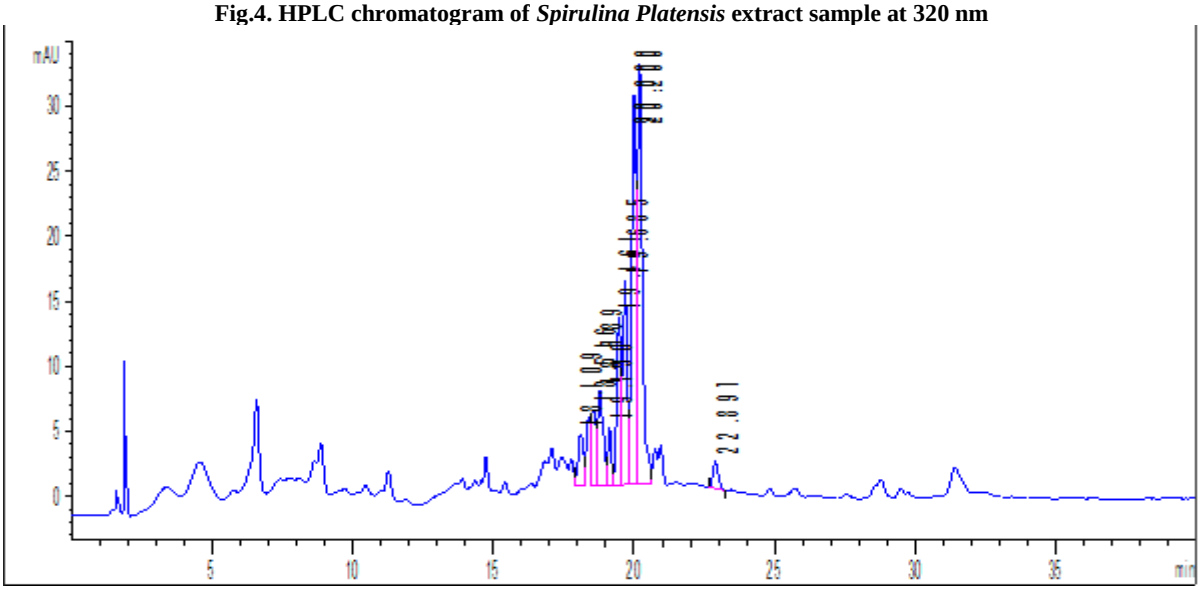
Phenolic compounds ترکیبات فنولیک	The amount of compounds (mg/lit) میزان ترکیبات (میلی‌گرم بر لیتر)		Retention time (min) زمان بازداری (دقیقه)
	M. oleifera extract عصاره گیاه گازرخ	*S. platensis* extract عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس	
Catechin کاتچین	12.98	ND	8.3
Quercetin کوئرستین	2.04	ND	21.6
Vanilin وانیلین	0.42	ND	13.5
Hesperedin هسپریدین	3.50	ND	18.5
Hesperetin هسپرتین	6.37	ND	22.4
Rosmarinic acid رزمارینیک اسید	5.79	4.62	19.2

* ND= Not Detected



شکل ٤- کروماتوگرام HPLC نمونه عصاره *اسپیرولینا پلاتنسیس* در طول موج ۳۲۰ نانومتر

Fig.4. HPLC chromatogram of *Spirulina Platensis* extract sample at 320 nm



شکل ٥- کروماتوگرام HPLC نمونه عصاره گیاه گازرخ در طول موج ۳۲۰ نانومتر

Fig.5. HPLC chromatogram of *Moringa oleifera* extract sample at 320 nm

جدول ۸- مقایسه میزان ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره جلبک *اسپیرولینا* در مطالعات مختلف با مطالعه حاضر

Table 8– Comparison of phenolic compounds detected in *Spirulina platensis* extract in different studies with the present study

***Spirulina platensis* extract** **عصاره جلبک اسپیرولینا**		
phenolic compounds **ترکیبات فنولیک**	**amount of compounds** **میزان ترکیبات**	**Reference** **منبع**
Catechin **کاتچین**	584.53 ND	Seghiri et al., 2019 current study مطالعه حاضر
Gallic acid **گالیک اسید**	396 2.13 ND	De Souza et al., 2015 Seghiri et al., 2019 current study مطالعه حاضر
Quercetin **کوئرستین**	0.04 ND	Seghiri et al., 2019 current study مطالعه حاضر
Vanilin **وانیلین**	16.24 ND	Seghiri et al., 2019 current study مطالعه حاضر
Rosmarinic acid **رزمارینیک اسید**	0.18 5.79	Seghiri et al., 2019 current study مطالعه حاضر
Caffeic acid **کافئیک اسید**	347 ND	De Souza et al., 2015 current study مطالعه حاضر
Salicylic acid **سالیسیلیک اسید**	54 ND	De Souza et al., 2015 current study مطالعه حاضر
Trans-Cinnamic acid **ترانس-سینامیک اسید**	0.08 3.5 ND	Seghiri et al., 2019 De Souza et al., 2015 current study مطالعه حاضر

جدول ۹- مقایسه میزان ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره گیاه *گازرخ* در مطالعات مختلف با مطالعه حاضر

Table 9- Comparison of phenolic compounds detected in *Moringa oleifera* extract in different studies with the present study

***Moringa oleifera* extract** **عصاره گیاه گازرخ**		
phenolic compounds **ترکیبات فنولیک**	**amount of compounds** **میزان ترکیبات**	**Reference** **منبع**
Catechin **کاتچین**	10.08 12.98	Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Gallic acid **گالیک اسید**	534.4 83.59 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Quercetin **کوئرستین**	807 92.73 2.04	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Vanilin **وانیلین**	0.42	current study مطالعه حاضر
Hesperedin	3.50	current study

هسپریدین		مطالعه حاضر
Hesperetin **هسپرتین**	6.37	current study مطالعه حاضر
Rosmarinic acid **رزمارینیک اسید**	5.79	current study مطالعه حاضر
Chlorogenic acid **کلروژنیک اسید**	488.5 57.24 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 مطالعه حاضر
Ellagic acid **الاژیک اسید**	189.1 45.83 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Kaempferol **کامفرول**	497.6 58.15 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Rutin **روتین**	190 17.05 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Caffeic acid **کافئیک اسید**	10.47 ND	Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Ferulic acid **فرولیک اسید**	128.2 ND	Verma et al., 2009 current study مطالعه حاضر

متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیب‌های آلی هستند که مستقیماً در رشد، نمو یا تولیدمثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده‌تری نسبت به متابولیت‌های اولیه (مثلاً اسیدهای آمینه) که برای بقاء زندگی سلول‌ها ضروری‌اند می‌باشند. اسانس‌ها، فلاوونوئیدها و رزمارینیک اسید از جمله مهم‌ترین این ترکیب‌ها هستند. رزمارینیک اسید یک ترکیب اسید فنولی است که در گیاه به‌عنوان ضدویروس، ضدباکتری و ضدالتهاب عمل کرده و همچنین از خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار می‌باشد (Petersen & Simmonds, 2003). رزمارینیک اسید به‌عنوان داروی گیاهی بالقوه محسوب شده و به‌خاطر خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آن مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیب در جنوب اروپا، ژاپن و هند برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سردرد، درد معده، دیابت، رفع نیش حشرات و آکنه استفاده می‌شود (Petersen & Simmonds, 2003). رزمارینیک اسید یک ترکیب فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدنی است که در گیاهان تیره‌های گاوزبان[1] و نعناعیان[2] یافت می‌شود (Petersen & Simmonds, 2003). رزمارینیک اسید ترکیب اصلی رزماری است که به‌عنوان مواد افزودنی غذایی بخصوص در غذاهای مدیترانه‌ای مورد استفاده قرار گرفته و اثرات نگهدارندگی آن با عمل آنتی‌اکسیدانی نسبت داده شده است (Martinez-Tome et al., 2001). رزمارینیک اسید می‌تواند به‌عنوان یک مهارکننده قوی سنتزهای سوپراکسید و NO و یک محافظ در برابر آسیب ناشی از پراکسی نیتریت عمل کند؛ مکانیسم‌های مهار آن‌ها نشان داده که تا حدی مبتنی بر توانایی مهار فسفوریلاسیون سرین است (Qiao et al., 2005).

ترکیبات فلاوونوئید و فنولیک متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط گیاهان در پاسخ به شرایط سخت محیطی تولید می‌شوند. محققان زیادی از مزایای گیاه گازرخ گزارش داده‌اند؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Lalas & Tsaknis, Karageorgou et al., 2017;

1 *Boraginaceae*
2 *Lamiacea*

2002) ، فلاوونوئیدهای زیست فعال (Lin et al., 2018)، اثرات ایمنی‌بخش و ضددیابتی (Bamagous et al., 2018)، ضدباکتریایی و ضدسرطان (Guillén-Román et al., 2018) گزارش شده است.

Verma و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی پلی‌فنول‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شده توسط HPLC در عصاره برگ‌های گیاه گازرخ بیان کردند که عصاره این گیاه حاوی اسیدهای فنولیک (گالیک اسید، کلروژنیک، الاژیک و فرولیک) و فلاوونوئیدها (کامفرول، کوئرستین و روتین) است (Verma et al., 2009) . فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی اصولاً مربوط به ویژگی‌های احیاءکنندگی آن‌ها می‌باشد. این ترکیبات قادرند به‌واسطه قدرت احیاءکنندگی خود به‌عنوان یک عامل اهداءکننده هیدروژن یا الکترون و یا غیرفعال‌کننده اکسیژن یگانه عمل کرده و از این طریق مانع از انجام فرآیندهای اکسیداسیون شوند. فلاوونوئیدها دارای خاصیت ضدمیکروبی، ضدالتهابی، ضدتب، ضدآلرژی و خواص ضداکسیدان می‌باشند. کاتچین‌ها نوعی آنتی‌اکسیدان و از مهم‌ترین فلاوونوئیدها به‌شمار می‌روند. فراوان‌ترین و فعال‌ترین کاتچین از نظر فعالیت آنتی-اکسیدانی اپی‌گالوکاتچین گالات است (Dalluge & Nelson, 2000). پژوهش‌ها نشان داده است که کاتچین از طریق مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش آسیب اکسیداتیو DNA از القاء آپوپتوز در سلول‌های آسیب‌دیده جلوگیری می‌کند (Ishii et al., 2008). به‌علاوه، پژوهش‌ها نشان داده‌اند کاتچین‌ها به‌عنوان یک آنتی-اکسیدان قوی با مهار استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی از تخریب بافتی جلوگیری می‌کند و نیز از طریق تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی موجب محافظت بافتی می‌شود. همچنین می‌توانند میزان آنتی‌اکسیدان‌های اندوژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهند (Senanayake, 2013). گزارش شده است کاتچین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما را افزایش داده و موجب کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد سلولی می‌شود. همچنین با کاهش شرایط استرس اکسیداتیو مانع از اثر عوامل جهش‌زا روی کروموزوم‌ها می‌شود (Crespy & Williamson, 2004). از گروه ترکیبات فنولی، به وانیلین در صنایع غذایی توجه فراوان شده است. وانیلین یا ۴-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزآلدهید ($C_8H_8O_3$)، به‌طور طبیعی در دانه گیاه *Vanilla planifolia* یافت می‌شود (Walton et al., 2003). از دیگر ترکیبات فنولی با وزن مولکولی کم، وانیلین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی را نشان می‌دهد از این‌رو پتانسیل استفاده به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی را دارد (Davidson & Naidu, 2000). این ماده در برابر باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی، گرم مثبت و گرم منفی عمل کرده و حتی نشان داده شده که در برابر کپک‌ها و مخمرها در پوره میوه و محیط رشد آزمایشگاهی مؤثر است (Fitzgerald et al., 2003).

هسپریدین یک فلاوونوئید گلیکوزیدی است که در تحقیقات متعدد اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیب به اثبات رسیده است (Tirkey et al., 2005). این مولکول دارای ساختار کریستالی پیچیده است که آن را از دیگر گلیکوزیدهای مشابه متمایز می‌کند که این باعث تأثیر بر حلالیت و سایر خواص فیزیکی و مشکل شدن خالص‌سازی آن می-گردد. به‌طور کلی قابلیت آنتی‌اکسیدانی هسپریدین به تعداد و ترتیب گروه‌های هیدروکسیل و میزان اتصالات ساختاری آن بستگی دارد (Ghorbani et al., 2016). نقش محافظتی هسپریدین به‌وسیله متوقف کردن رادیکال‌های آزاد تشکیل شده و در آن احیای سطوح آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نشان داده شده است (Pradeep et al., 2008). به‌علاوه، محققان دریافته‌اند که هسپریدین در محافظت لیپوزوم‌ها از پراکسیداسیون ناشی از تابش فرابنفش مؤثر بوده است که احتمالاً به علت مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده به‌وسیله تابش فرابنفش است (Bonina et al., 1996).

بررسی تغییرات پراکسید

نتایج تغییرات عدد پراکسید در نمونه‌های روغن در جدول ۱۰ ارائه شده است. تغییرات عدد پراکسید از زمان تولید و افزودن عصاره به مدت زمان ۸ ساعت در فواصل ۲ ساعت بررسی گردید. مطابق با نتایج ارائه شده در جدول ۱۰ کمترین میزان عدد پراکسید (meq O_2/kg ۰/۳۸) مربوط به نمونه حاوی عصاره گیاه گازرخ در زمان سوم نگهداری بود، بیش‌ترین میزان پراکسید در نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ در محدوده meq O_2/kg ۱۵ مشاهده گردید.

جدول ۱۰- بررسی روند تغییرات عدد پراکسید (meq O_2/kg) نمونه‌های روغن زیتون بکر*

Table 10- Evaluation of the trend of changes in peroxide index (meq O_2/kg) of virgin olive oil samples*

Storage time (hr.) زمان نگهداری (ساعت)	Control sample نمونه شاهد	Sample containing spirulina extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا	Sample containing Moringa extract نمونه حاوی عصاره گازرخ	Sample containing spirulina and Moringa extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا و گازرخ	Sample containing TBHQ نمونه حاوی TBHQ

First time زمان اول	9.48± 0.13^{aD**}	3.89± 0.065^{bA}	1.19± 0.00^{cA}	1.97± 0.00^{cA}	9.53 ±0.045^{aD}
Second time زمان دوم	12.01± 0.13^{aC}	3.95 ±0.025^{bA}	1.97± 0.015^{cA}	1.91 ±0.005^{cB}	12.04 ±0.05^{aC}
Third time زمان سوم	13.10± 0.14^{aB}	1.98 ±0.005^{bB}	0.38± 0.005^{dC}	0.78 ±0.01^{cD}	13.02 ±0.12^{aB}
Fourth time زمان چهارم	15.72± 0.12^{aA}	1.18 ±0.005^{bC}	1.18± 0.005^{bB}	0.78 ±0.005^{cD}	15.76 ±0.16^{aA}
Fifth time زمان پنجم	15.65± 0.2^{aA}	0.79 ±0.005^{bD}	1.19± 0.005^{bB}	1.16 ±0.015^{bC}	15.38 ±0.16^{aA}

* داده‌ها بر حسب (میانگین± خطای استاندارد) در دو تکرار گزارش شده است. Data are reported in terms of (mean± standard error) in two replications.

**حروف کوچک (a-d) مشابه در هر ردیف و حروف بزرگ (A-D) مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنادار (p<۰/۰۵) بر اساس آزمون دانکن بین داده‌ها است.

**The similar small letters (a-d) in each row and the similar capital letters (A-D) in each column indicate no significant difference (p <0.05) based on Duncan's test between data.

نمونه شاهد و روغن حاوی آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ در طی این بازه زمان، افزایش عدد پراکسید را نشان دادند که این افزایش نسبت به زمان اول اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). نمونه‌های روغن حاوی عصاره‌های گیاهی کاهش معنی‌داری در زمان پایانی نگهداری نسبت به زمان اول افزودن عصاره‌ها نشان دادند (p<۰/۰۵)؛ با این حال که هر سه نمونه حاوی عصاره در زمان پایان نگهداری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (p>۰/۰۵). نمونه‌های حاوی عصاره در زمان پایان نگهداری با نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ اختلاف معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵). تیمار شاهد و تیمار حاوی TBHQ دارای بالاترین مقدار عدد پراکسید بود و با تیمارهای حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در تمامی زمان‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p <۰/۰۵). با این‌حال، نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ در زمان‌های پایانی نگهداری میزان عدد پراکسید از میزان ۲۰ میلی-اکی‌والان پراکسید در کیلوگرم (باتوجه به اصل عمومی فساد روغن در این نقطه) بیشتر افزایش نیافت که این امر نشان‌دهنده مقاومت بالای روغن زیتون بکر در برابر اکسیداسیون به‌دلیل آنتی‌اکسیدان‌های ذاتی و سطح غیراشباعیت پایین است (Keramat & Golmakani, 2016). نتایج حاکی از آن است که با افزودن عصاره‌های ریزجلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ به روغن زیتون بکر مقدار پراکسید در نمونه حاوی عصاره‌ها نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته و عدد پراکسید در این تیمارها مقاومت بیشتری در مقابل افزایش نشان داد. کاهش اندیس پراکسید در اثر افزودن عصاره‌ها را می‌توان به ترکیبات فنولیک و سایر ترکیبات ضداکسایشی موجود در عصاره‌ها نسبت داد. ترکیبات فنولیک با داشتن خاصیت ضداکسایشی، بیشترین اهمیت را در پایداری اکسیداتیو روغن دارند. ترکیبات پلی‌فنولیک با از دست دادن یک اتم هیدروژن به‌صورت رادیکال آزاد در آمده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند.

احتمال دیگر در بیان دلیل کاهش پراکسید مربوط به شکست پراکسید و هیدروپراکسیدها و تبدیل آن‌ها به ترکیبات ثانویه نظیر آلدئیدها، کتون‌ها و کتواسیدها می‌باشد، در نتیجه کاهش میزان اندیس پراکسید را به دنبال داشته است (Dehlei et al., 2016). بنابر گزارش ارائه شده توسطTabee و همکاران (۲۰۰۸)، میزان پراکسید روغن زیتون با افزودن گیاهان و ادویه‌های ضداکسایشی کاهش می-یابد که این گزارش با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه همخوانی دارد (Tabee et al., 2008).

ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در *اسپیرولینا پلاتنسیس*، مانند آلفا و بتا-کاروتن، زانتوفیل، کریپتوزانتین، زاگزانتین، ویتامین C، توکوفرول، ترکیبات قطبی پلی‌فنولیک و به‌ویژه رنگدانه فیکوسیانین از طریق برهم‌کنش‌های سینرژیستی، مهار رادیکال‌های آزاد و مکانیسم شلاته‌کنندگی فلزات، از پراکسیداسیون لیپیدی ممانعت می‌کند و با این فرآیند اکسیداسیون را به تأخیر می‌اندازد (Samad et al., 2007).

نتایج تغییرات عدد پراکسید در شرایط تسریع شده نشان داد که نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ نسبت به نمونه‌های حاوی عصاره با سرعت بیشتری افزایش یافت. با توجه به ترکیبات پلی‌فنولیک موجود در عصاره گیاه گازرخ و عصاره اسپیرولینا می‌توان بیان کرد که کاهش سرعت اکسیداسیون در نمونه‌های حاوی عصاره با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات ارتباط مستقیمی دارد. Morsy و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که مهار اکسیداسیون و افزایش ماندگاری روغن زیتون (تا ۴۷۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) در نتیجه محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره اسپیرولینا موجود در نمونه روغن است (Morsy et al., 2019). بنابراین، توانایی توقف مراحل ابتدایی و پیشرفت واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون توسط عصاره گیاه گازرخ و اسپیرولینا عمدتاً به دلیل وجود این ترکیبات است. از طرفی دیگر، در مطالعه‌ای بیان شده که مخلوط ترکیبات فعال زیستی و محصولات جانبی آن‌ها موجود در عصاره‌های گیاهی و

محصولات طبیعی مختلف اثرات هم‌افزایی ایجاد می‌کند (Sonam & Guleria, 2017).

همچنین مطابق با نتایج Hajimehdipoor و همکاران (۲۰۱۴) استفاده از دو و یا بیشتر برخی از ترکیبات فنولی و فلاوونوئید می‌تواند اثرات آنتی‌اکسیدانی و به عبارتی اثرات هم‌افزایی را افزایش دهد؛ با این‌حال، لازم به ذکر است که ترکیب دوتایی گالیک اسید و رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، روتین و کوئرستین اثر هم‌افزایی بیش‌تری نسبت به ترکیب سه‌تایی آن‌ها دارد در حالی‌که در ترکیب دوتایی آن‌ها هیچ‌گونه اثر هم‌ستیزی مشاهده نشده است. از طرفی برخی ترکیبات فنولی و فلاونوئید، می‌توانند اثرات هم‌ستیزی نشان دهند؛ در مطالعه‌ای در همین راستا در ترکیبات سه‌تایی روتین، کافئیک اسید، رزمارینیک اسید (۲۱/۸- درصد) و روتین، کلروژنیک اسید و کافئیک‌اسید (۱۵/۸- درصد) بیش‌ترین اثرات هم‌ستیزی را نشان داده‌اند (Hajimehdipoor et al., 2014).

بررسی تغییرات ضریب شکست

نتایج تغییرات ضریب شکست روغن زیتون بکر در جدول ۱۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که تغییرات ضریب شکست در تمام تیمارها در محدوده استاندارد است و افزودن عصاره‌ها برروی این فاکتور تأثیر منفی نداشته است.

جدول ۱۱- بررسی روند تغییرات ضریب شکست نمونه‌های روغن زیتون بکر

Table 11- Investigation of the trend of changes in the refractive index of virgin olive oil samples

Standard range (1446) محدوده استاندارد (١٤٤٦)	Abundance فراوانی	Treatments تیمار
1.4677- 1.4705	1.4677	Control sample نمونه شاهد
	1.4579	Sample containing spirulina extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا
	1.4678	Sample containing Moringa extract نمونه حاوی عصاره گازرخ
	1.4678	Sample containing spirulina and Moringa extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا و گازرخ
	1.4677	Sample containing TBHQ نمونه حاوی TBHQ

روغن‌ها و چربی‌های مختلف ضریب شکست خاص خود را دارند لذا این ویژگی، برای تشخیص هویت و تعیین خلوص روغن‌ها و چربی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. ضریب شکست در کنترل پیشرفت واکنش‌ها نظیر هیدروژناسیون و ایزومریزاسیون کاتالیزوری روغن‌ها مفید است. همچنین برای تشخیص اکسایش روغن نیز از ضریب شکست استفاده می‌شود؛ براین اساس شاید بتوان علت عدم تغییر ضریب شکست در بین نمونه‌ها را چنین بیان کرد که چون تغییرات پراکسید در حدی پایین‌تر از میزان استاندارد تعیین شده بوده تغییری در میزان ضریب شکست نمونه‌ها مشاهده نشده است. درجه حرارت و اشباعیت از عوامل مؤثر بر ضریب شکست هستند. از طرفی ضریب شکست نماد خوبی از تغییر میزان سیرنشدگی روغن‌ها و چربی‌ها بر اثر فرآیند هیدروژن‌دهی است. ضریب شکست روغن‌ها تابعی از وزن مولکولی، طول زنجیر اسید چرب، درجه سیرنشدگی و میزان پیوندهای دوگانه مزدوج آن‌ها است (Nichols & Sanderson, 2003). مطالعه صورت گرفته توسط Keramat و همکاران (۲۰۱۴) که به بررسی اثر اسانس رزماری بر روغن زیتون بکر پرداخته بودند ضریب شکست روغن در محدوده استاندارد بود که با پژوهش حاضر همخوانی دارد (Keramat et al., 2014).

بررسی تغییرات رنگ (L*, a*, b*)

نتایج بررسی تغییرات رنگ در شاخص‌های L*، a* و b* بعد از افزودن عصاره‌های گیاهی به روغن زیتون بکر در جدول ۱۲ گزارش شده است. پارامتر L* معیار روشنایی در روغن بوده و از ۰ (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید) متغیر است.

با توجه به نتایج ارائه شده پارامتر L* در نمونه حاوی عصاره گیاه گازرخ کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد وجود داشت ($p<0/05$)، ولی با نمونه‌های حاوی عصاره اسپیرولینا و نمونه حاوی مخلوط هردو عصاره و نمونه حاوی TBHQ اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). شاخص a* بیانگر رنگ بین سبز تا قرمز می‌باشد. اعداد مثبت a* نشان‌دهنده رنگ قرمز و اعداد منفی نشان دهنده رنگ سبز می‌باشد. باتوجه به نتایج ارائه شده پارامتر a* در نمونه حاوی عصاره گازرخ و نمونه حاوی مخلوط عصاره‌ها افزایش معنی-

داری نسبت به سایر نمونه‌ها نشان داد (p<۰/۰۵) که نشان‌دهنده این است که رنگ سبز روغن زیتون بکر در این دو نمونه کاهش یافته است. محدوده پارامتر *b از ۱۰۰+ (زرد) تا ۱۰۰- (آبی) است که با توجه به نتایج جدول ۱۲ نمونه حاوی مخلوط عصاره‌ها کاهش زردی معنی‌داری در روغن زیتون بکر نسبت به سایر نمونه‌ها داشته است (p<۰/۰۵).

جدول ۱۲- بررسی روند تغییرات رنگ (L*, a*, b*) نمونه‌های روغن زیتون بکر*

Table 12- Investigation of color change trends (L *, a *, b *) of virgin olive oil samples*

Color index شاخص رنگ	Control sample نمونه شاهد	Sample containing spirulina extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا	Sample containing Moringa extract نمونه حاوی عصاره گازرخ	Sample containing spirulina and Moringa extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا و گازرخ	Sample containing TBHQ نمونه حاوی TBHQ
L*	57.86± 1.05[a**]	56.57± 1.74[ab]	53.00± 1.25[b]	54.29± 1.12[ab]	56.71± 0.80[ab]
a*	-5.00± 0.00[b]	-4.71± 0.42[b]	-2.29± 0.28[a]	-2.00± 0.52[a]	-4.29± 0.36[b]
b*	37.29± 1.68[a]	35.29± 1.39[a]	30.00± 4.95[a]	18.43± 1.39[b]	30.71± 2.23[a]
ΔE	0	8.05± 1.63[b]	16.10± 2.11[a]	19.99± 1.68[a]	8.40± 1.97[b]

* داده‌ها بر حسب (میانگین± خطای استاندارد) در دو تکرار گزارش شده است. Data are reported in terms of (mean± standard error) in two replications.

**حروف کوچک (a-b) مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم اختلاف معنادار (p<۰/۰۵) بر اساس آزمون دانکن بین داده‌ها است.

**The similar small letters (a-d) in each row indicate no significant difference (p <0.05) based on Duncan's test between data.

افزودن عصاره اسپیرولینا به تنهایی روغن زیتون بکر اختلاف معنی‌داری را با نمونه شاهد در تمام پارامترهای رنگی ایجاد نکرد (p>۰/۰۵) ولی نمونه حاوی عصاره گیاه گازرخ و نمونه حاوی ترکیب هردو عصاره در تمام پارامترهای رنگ اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد نشان دادند (p <۰/۰۵). از طرفی دیگر، فاکتور اختلاف رنگ (ΔE) نیز تأیید کننده این موضوع است که اختلاف رنگی میان نمونه-های حاوی عصاره گیاه گازرخ و نمونه حاوی ترکیب هردو عصاره با نمونه شاهد وجود دارد ولی در نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا مقدار عددی پایین اختلاف رنگ (ΔE) تأیید کرد که این نمونه با نمونه شاهد اختلاف رنگی زیادی وجود ندارد. در واقع می‌توان بیان کرد افزودن عصاره اسپیرولینا به روغن زیتون بکر اثر نامطلوبی بر رنگ روغن نداشته است. رنگ به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی و خاصیت در آگاهی یافتن از کیفیت محصول شناخته می‌شود. رنگ روغن زیتون بکر در اثر رنگ‌های سبز و زرد به علت وجود کاروتنوئیدها و کلروفیل‌ها است. رنگ روغن زیتون تحت تأثیر شاخص رسیدگی، رقم زیتون، منطقه تولید، نحوه استخراج و شرایط نگهداری قرار می‌گیرد (Boskou et al., 2006). اختلاف رنگی نمونه‌های حاوی عصاره با نمونه شاهد نشان می‌دهد که افزودن عصاره‌ها به روغن باعث کاهش شاخص روشنایی روغن (کاهش در اندیس *L)، کاهش رنگ سبز (کاهش اندیس *a به سمت مثبت) (هرچه شاخص *a منفی‌تر باشد، رنگ سبز روشن‌تر را نشان می‌دهد) و کاهش رنگ زرد روغن (کاهش اندیس *b) شده‌اند. نتایج حاصل از این پارامترها می‌تواند بیانگر مشارکت رنگدانه‌های موجود در عصاره‌های اسپیرولینا و گیاه گازرخ در رنگ روغن زیتون بکر باشد. در مطالعه Ayadi و همکاران (۲۰۰۹) تمام پارامترهای رنگ L*,a*,b* در نمونه‌های روغن زیتون فرابکر حاوی عصاره گیاهان آروماتیک تونسی نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. این محققان، علت این تغییر را به مهاجرت ترکیبات از گیاهان آروماتیک به روغن زیتون در طی فرآیند ماسراسیون نسبت دادند و بیان کردند که این ترکیبات می‌توانند اسیدهای آلی، ترکیبات فنولیک، رنگدانه‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و اسانس‌ها باشند (Ayadi et al., 2009)؛ نتایج این محققان با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در این مطالعه علت بررسی رنگ روغن زیتون به دلیل بررسی خصوصیات ظاهری روغن بوده، از آنجا که افزودن دو آنتی‌اکسیدان طبیعی از عصاره‌های اسپیرولینا و گیاه گازرخ که خود دارای رنگ سبز هستند می‌تواند بر خصوصیات حسی و ظاهری مطلوب محصول اثر منفی بگذارد و بازارپسندی محصول کاهش یابد. از طرفی به دلیل اینکه یکی از خصوصیات ظاهری روغن زیتون، رنگ آن است و از نظر مصرف کننده دارای اهمیت است لذا بررسی فاکتور رنگ در کنار سایر خصوصیات مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، فراوانی مواد فعال طبیعی موجود در عصاره‌های ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* (*Spirulina platensis*) و گیاه گازرخ (*Moringa oleifera*) به‌عنوان مهارکننده‌های رادیکال آزاد عمل کرده و یا جهت محافظت از فنول‌های کل مانند توکوفرول، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در روغن زیتون بکر، در برابر تخریب

اکسیداسیون حرارتی نقش داشته باشند. نتایج نشان داد که ترکیبات مؤثره در عصاره‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه گازرخ، ترکیبات پلی‌فنولی رزمارینیک اسید، کاتچین، کوئرستین، وانیلین، هسپریدین، هسپرتین است. از این‌رو، عصاره‌ها سرعت اکسیداسیون روغن زیتون بکر را کاهش می‌دهند و می‌توان بیان کرد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی هردو عصاره به دلیل اثر تشدیدکنندگی بین ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها است. تغییرات عدد پراکسید در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، نشان داد که عصاره‌های اسپیرولینا و گیاه گازرخ به‌صورت جداگانه و هم به‌صورت ترکیب با یکدیگر قادر به کاهش سرعت اکسیداسیون روغن زیتون بکر شده بود و باعث کمتر شدن عدد پراکسید در این سه نمونه شده که قابل مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ نمی‌باشد. ضریب شکست نمونه‌های روغن با افزودن عصاره‌ها تغییر نکرد و در محدوده استاندارد بود. همچنین اختلاف رنگی نمونه‌های حاوی عصاره در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد که افزودن عصاره‌ها به روغن باعث کاهش اندیس*L، کاهش اندیس*a و کاهش اندیس*b شده‌اند. براساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان بیان کرد که هردو عصاره دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قوی هستند که می‌توان از آن‌ها با میزان به‌کار برده شده در مطالعه (۱۰۰۰ppmدر ۱۰۰ گرم روغن زیتون فرابکر) برای غذاهایی با چربی بالا و فاسد شدنی به خوبی استفاده کرد. از این‌رو با شناخت اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس و گیاه گازرخ می‌توان از آن‌ها برای استفاده صنعتی و جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی بهره برد

منابع

1. Abu Zaid, A. A., Hammad, D. M., & Sharaf, E. M. (2015). Antioxidant and anticancer activity of *Spirulina platensis* water extracts. *International journal of pharmacology*, 11(7), 846-851.
2. Afshari-Jouybari, H., & Farahnaky, A. (2011). Evaluation of Photoshop software potential for food colorimetry. J*ournal of food engineering*, 106(2), 170-175. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.034
3. Ayadi, M., Grati-Kamoun, N., & Attia, H. (2009). Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and chemical toxicology*, 47(10), 2613-2619. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.024
4. Baldisserotto, A., Buso, P., Radice, M., Dissette, V., Lampronti, I., Gambari, R., & Vertuani, S. (2018). *Moringa oleifera* leaf extracts as multifunctional ingredients for "natural and organic" sunscreens and photoprotective preparations. *Molecules*, 23(3), 664. https://doi.org/10.3390/molecules23030664
5. Bamagous, G. A., Al Ghamdi, S. S., Ibrahim, I. A. A., Mahfoz, A. M., Afify, M. A., Alsugoor, M. H., Rengarajan, T. (2018). Antidiabetic and antioxidant activity of ethyl acetate extract fraction of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetes rats via inhibition of inflammatory mediators. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(6), 320 . DOI: 10.4103/2221-1691.235327
6. Belay, A. (2008). Spirulina (Arthrospira): production and quality assurance. Spirulina in human nutrition and health, 1 .
7. Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., & Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *Journal of applied phycology*, 5(2), 235-241. https://doi.org/10.1007/BF00004024
8. Bonina, F., Lanza, M., Montenegro, L., Puglisi, C., Tomaino, A., Trombetta, D., Saija, A. (1996). Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *International Journal of Pharmaceutics*, 145(1-2), 87-94. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04728-X
9. Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. In Olive Oil (pp. 41-72): Elsevier. https://doi.org/10.4324/9781003040217
10. Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., & Mendez, J. (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3), 379-381. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00413-5
11. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
12. Choonawala, B. B. (2007). Spirulina production in brine effluent from cooling towers. https://doi.org/10.51415/10321/134
13. Cohen, Z. (1997). The chemicals of Spirulina. Spirulina platensis, 175-204.
14. Crespy, V., & Williamson, G. (2004). A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3431S-3440S. https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000100020
15. Cuellar-Nuñez, M. L., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gallegos-Corona, M. A., De Mejía, E. G., & Loarca-Piña, G. (2018). Physicochemical and nutraceutical properties of *moringa* (*Moringa oleifera*) leaves and their effects in an in vivo AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model. *Food research international*, 105, 159-168. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.004
16. Dalluge, J. J., & Nelson, B. C. (2000). Determination of tea catechins. *Journal of chromatography A*, 881 (1-2), 411-424. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00062-5

17. Dartsch, P. C. (2008). Antioxidant potential of selected *Spirulina platensis* preparations. Phytotherapy Research: *An International Journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives*, 22(5), 627-633. https://doi.org/10.1002/ptr.2310
18. Davidson, P., & Naidu, A. (2000) .Phyto-phenols. In Natural food antimicrobial systems (pp. 278-307): CRC Press.
19. Dehlei, Z., Danesh, M. F., & Sahari, M. (2016). Comparative investigation of red pepper (*Capsicum annuum* L.) extraction by ultrasonic and thermal methods and effect of it's extract on oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of food science & technology*, 13(52), (2008-8787).
20. De Souza, T. D., Prietto, L., de Souza, M. M., & Furlong, E. B. (2015). Profile, antioxidant potential, and applicability of phenolic compounds extracted from *Spirulina platensis. African journal of biotechnology*, 14(41), 2903-2909. DOI: 10.5897/AJB2015.14926
21. Dhargalkar, V., & Pereira, N. (2005). Seaweed: promising plant of the millennium .
22. Egea, B. C. B. M. B., Campos, A. L. M. J. I., DE Carvalho–Eliane, J. C. M., & Danesi, D. G. (2014). Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre. *Journal of food and nutrition Research* (ISSN 1336-8672), 53(2), 171-179.
23. Fayyad, R. J., Mohammed Ali, A., Dwaish, A. S., & Khayoon, A. (2019). Anticancer Activity of *Spirulina platensis* Methanolic extracts against l20b and MCF7 Human Cancer Cell Lines. *Plant Arch*, 19(1), 1419-1426 .
24. Fitzgerald, D. J., Stratford, M., & Narbad, A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 113-122 .
25. Frankel, E. N. (2010). Chemistry of extra virgin olive oil: adulteration, oxidative stability, and antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 5991-6006. https://doi.org/10.1021/jf1007677
26. Ghorbani, Z., Haddadi, G., & Fardid, R. (2016). Hesperidin as a natural Radio-Protector. *Journal of fasa university of medical sciences*, 5(4), 449-459.
27. Guillén-Román, C. J., Guevara-González, R. G., Rocha-Guzmán, N. E., Mercado-Luna, A., & Perez-Perez, M .C. I. (2018). Effect of nitrogen privation on the phenolics contents, antioxidant and antibacterial activities in *Moringa oleifera* leaves. *Industrial crops and products*, 114, 45-51. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.048
28. Hajimehdipoor, H., Shahrestani, R., & Shekarchi, M. (2014). Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research journal of pharmacognosy*, 1(3), 35-40 .
29. Heneman, K., & Zidenberg-Cherr, S. (2008). Nutrition and health info sheet: Phytochemicals.
30. Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Ž., & Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food chemistry*, 71(2), 229-233. https://doi.org/10.3733/ucanr.8313
31. Iqbal, S., & Bhanger, M. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 544-551. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.001
32. Iran, I. o. S. a. I. R. o. (2011). Animal and vegetable fats and oils - Determination of refractive index. ISIRI no 5108, 1st. Revision.
33. Iran, I. o. S. a. I. R. o. (2018). Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination. INSO no 4179, 2nd Revision (Identical with ISO 3960:2017).
34. Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., Kumazawa, S., Akagawa, M. (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free radical biology and medicine*, 45(10), 1384-1394. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.023
35. Karageorgou, I., Grigorakis, S., Lalas, S., & Makris, D. P. (2017). Enhanced extraction of antioxidant polyphenols from *Moringa oleifera* Lam. leaves using a biomolecule-based low-transition temperature mixture. *European food research and technology*, 243(10), 1839-1848. https://doi.org/10.1007/s00217-017-2887-1
36. Kepekçi, R. A., & Saygideger, S. D. (2012). Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. *Journal of applied Phycology*, 24(4), 897-905. https://doi.org/10.1007/s10811-011-9710-3
37. Keramat M, Golmakani M T, Lari M A, Alavi N, Norozi M, Shekar Foroosh S. (2014). Investigation the oxidative stability of virgin olive oil by using rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil. FSCT. 0; 13 (60):157-172[In Persian].
38. Keramat, M., & Golmakani, M. (2016). Effect of Thymus vulgaris and Bunium persicum essential oils on the oxidative stability of virgin olive oil. *Grasas y aceites*, 67(4), 162. https://doi.org/10.3989/gya.0337161
39. Khalighi-Sigaroodi, F., Ahvazi, M., Hadjiakhoondi, A., Taghizadeh, M., Yazdani, D., Khalighi-Sigaroodi, S., & Bidel, S. (2012). Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family. *Iranian journal of pharmaceutical research*: IJPR, 11(1), 295.

40. Kuda, T., Taniguchi, E., Nishizawa, M., & Araki, Y. (2002). Fate of water-soluble polysaccharides in dried Chorda filum a brown alga during water washing. *Journal of food composition and analysis*, 15(1), 3-9. https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1037
41. Lalas, S., & Tsaknis, J. (2002). Extraction and identification of natural antioxidant from the seeds of the *Moringa oleifera* tree variety of Malawi. *Journal of the American oil chemists' society*, 79(7), 677-683. https://doi.org/10.1007/s11746-002-0542-2
42. Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P., & Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food chemistry*, 112(2), 454-460. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.111
43. Lin, M., Zhang, J., & Chen, X. (2018). Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of functional foods*, 47, 469-479. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.011
44. Makita, C., Chimuka, L., Steenkamp, P., Cukrowska, E., & Madala, E. (2016). Comparative analyses of flavonoid content in *Moringa oleifera* and *Moringa ovalifolia* with the aid of UHPLC-qTOF-MS fingerprinting. *South African journal of botany*, 105, 116-122. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.12.007
45. Martinez-Tome, M., Jimenez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., & Murcia, M. A. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of food protection*, 64(9), 1412-1419. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.9.1412
46. Mendiola, J., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., & Señoráns, F. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food chemistry*, 102(4), 1357-1367. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.068
47. M'hiri, N., Ioannou, I., Boudhrioua, N. M., & Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and bioproducts processing*, 96, 161-170. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010
48. Morales, M. T., & Przybylski, R. (2013). Olive oil oxidation. In Handbook of olive oil (pp. 479-522): Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_13
49. Morsy, M. K., Morsy, O. M., Elbarbary, H. A., & Saad, M. A. (2019). Enhancing of oxidative stability and quality attributes of olive oil using spirulina (*Arthrospira platensis*) nanoparticles. *LWT*, 101, 444-455. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.056
50. Nichols, D. S., & Sanderson, K. (2003). The nomenclature, structure, and properties of food lipids. *Chemical and functional properties of food lipids*, 29-59.
51. O'brien, R. D. (2008). Fats and oils: formulating and processing for applications: CRC press. https://doi.org/10.1201/9781420061673
52. Onsare, J. G., & Arora, D. S. (2015). Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Journal of applied microbiology*, 118(2), 313-325. https://doi.org/10.1111/jam.12701
53. Oyeniran, O. H., Ademiluyi, A. O., & Oboh, G. (2020). Comparative study of the phenolic profile, antioxidant properties, and inhibitory effects of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) and Almond (*Terminalia catappa* Linn.) leaves on acetylcholinesterase and monoamine oxidase activities in the head region of Fruitfly (Drosophila melanogaster Meigen) in vitro. *Journal of Food Biochemistry*, e13401.
54. Ozdemir, G., Ulku Karabay, N., Dalay, M. C., & Pazarbasi, B. (2004). Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. Phytotherapy Research: An International Journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives, 18(9), 754-757. https://doi.org/10.1002/ptr.1541
55. Pagnussatt, F. A., Del Ponte, E. M., Garda-Buffon, J., & Badiale-Furlong, E. (2014). Inhibition of Fusarium graminearum growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. *Pesticide biochemistry and physiology*, 108, 21- 26. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.11.002
56. Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7
57. PhD, O. I. A. (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 8(1), 53-63. https://doi.org/10.1046/j.1440-6047.1999.00036.x
58. Piroddi, M., Albini, A., Fabiani, R., Giovannelli, L., Luceri, C., Natella, F., Servili, M. (2017). Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. *Biofactors*, 43(1), 17-41. https://doi.org/10.1002/biof.1318
59. Pradeep, K., Park, S. H., & Ko, K. C. (2008). Hesperidin a flavanoglycone protects against γ-irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague–Dawley rats. *European journal of pharmacology*, 587(1-3), 273-280. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.052

60. Qiao ,S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Takeuchi, F., Yoshino, M. (2005). Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264. 7 macrophages. *Free radical research*, 39(9), 995-1003. https://doi.org/10.1080/10715760500231836
61. Rallo, L., Díez ,C. M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F., & Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 491-509. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.034
62. Rasika, J. (2013). Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* and Its Synergism with Cleome Viscosa. *Int. J. Life Sciences*, 1(3), 182-189.
63. Rodriguez-Amaya, D. B. (2003). Food carotenoids: Analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. *In Forum of nutrition* (Vol. 56, p. 35).
64. Sahu, R. K., Kar, M., & Routray, R. (2013). DPPH free radical scavenging activity of some leafy vegetables used by tribals of Odisha, *India. J. Med. Plants*, 1(4), 21-27.
65. Samad, L. H., Azizi, M., & Barzegar, M. (2007). Antioxidative effect of pomegranate seed phenolic componends on soybean oil. 193-200.
66. Samanta, S. K., Kandimalla, R., Gogoi, B., Dutta, K. N., Choudhury, P., Deb, P. K., & Talukdar, N. C. (2018). Phytochemical portfolio and anticancer activity of Murraya koenigii and its primary active component, mahanine. *Pharmacological research*, 129, 227-236. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.024
67. Seghiri, R., Kharbach, M., & Essamri, A. (2019). Functional composition, nutritional properties, and biological activities of Moroccan *Spirulina microalga*. *Journal of food quality*, 2019 .
68. Senanayake, S. N. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications–A review. *Journal of functional foods*, 5(4), 1529-1541. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011
69. Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., Taticchi, A. (2014). Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*, 3(1), 1-23. https://doi.org/10.3390/antiox3010001
70. Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(8), 2144-2155. https://doi.org/10.1021/jf020444+
71. Silva, L., Pinto, J., Carrola, J., & Paiva-Martins, F. (2010). Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *Food chemistry*, 121(4), 1177-1187. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.001
72. Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M., & Catalan, C. (2006). Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food control*, 17(9), 745-752. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.03.010
73. Sonam, K. S., & Guleria, S. (2017). Synergistic antioxidant activity of natural products. *Annals of pharmacology and pharmaceutics*, 2(16), 1-6.
74. Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant foods for human nutrition*, 64(4), 303. https://doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0
75. Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempeferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food chemistry*, 108(3), 879-884. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.053
76. Szabo, M. R., Idiţoiu, C., Chambre, D., & Lupea, A. X. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical papers*, 61(3), 214-216. https://doi.org/10.2478/s11696-007-0022-7
77. Tabee, E., Azadmard-Damirchi, S., Jägerstad, M., & Dutta ,P. C. (2008). Effects of α-tocopherol on oxidative stability and phytosterol oxidation during heating in some regular and high-oleic vegetable oils. *Journal of the American oil chemists' society*, 85(9), 857-867. https://doi.org/10.1007/s11746-008-1274-2
78. Tirkey, N., Pilkhwal, S., Kuhad, A., & Chopra, K. (2005). Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC pharmacology*, 5(1), 2. https://doi.org/10.1186/1471-2210-5-2
79. Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., & Rao, C. V. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and chemical toxicology*, 47(9), 2196-2201. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.005
80. Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505-515. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00149-3
81. Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J., Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food chemistry*, 105(1), 36-41. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.054
82. Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., Xu, J. (2017). Characterization and metabolic diversity of flavonoids in citrus species. *Scientific reports*, 7(1), 1-10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10970-2

83. Xiang, N., Guo, X., Liu, F., Li, Q., Hu, J., Brennan, C. S. (2017). Effect of light-and dark-germination on the phenolic biosynthesis, phytochemical profiles, and antioxidant activities in sweet corn (*Zea mays* L.) sprouts. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1246. https://doi.org/10.3390/ijms18061246
84. Zhang, W. W., Duan, X. J., Huang, H. L., Zhang, Y., Wang, B. G. (2007). Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (*Rhodomelaceae*). *Journal of applied phycology*, 19(2), 97-108. https://doi.org/10.1007/s10811-006-9115-x

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 367- 382

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۸۲-۳۶۷

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

The effect of aqueous extract of white tea on heat resistance of sesame oil prepared by cold pressing

Sedigheh Yazdanpanah*[1], Sara Mohammadi[1], Amir hossein Elhamirad[2]

Received: 2021.06.14
Accepted: 2021.09.20

How to cite this article:
Yazdanpanah, S., Mohammadi, S., Elhamirad, A. H. (2022). The effect of aqueous extract of white tea on heat resistance of sesame oil prepared by cold pressing. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 367-382.

Abstract

Introduction: White tea is a new ingredient in a wide range of phenolic, antioxidant and antimicrobial compounds. The most important catechins in white tea are epicatechin, epigallocatechin, epicatechin- 3- galate, and epigallocatechin- 3- galate, which are flavonol gallates. The concentration of these phenolic compounds in white tea is higher than green tea. Sesame seed oil, which is produced by cold pressing method, has a great ability to preserve antioxidant compounds. Significant oxidative stability of sesame oil is due to the presence of lignan non-soapy substances. Strong antioxidant compounds in sesame seed oil include sesamol, sesamulin (antioxidant precursor), sesaminol and its isomers. The aim of this study was to investigate the effect of natural antioxidants of sesame oil and white tea on inhibiting the effect of metals on oxidation of sesame oil.

Materials and Methods: In this study, aqueous extract of white tea was extracted and sesame oil was produced using cold press. In the next step, six samples including control sample (sesame oil), sesame oil containing white tea extract, sesame oil containing white tea extract and 0.1 ppm iron, Sesame oil containing white tea extract and 0.1 ppm copper, sesame oil with tea and 0.1 ppm zinc extract and sesame oil containing 100 ppm BHT were prepared. In all samples, aqueous extract of white tea in the amount of 6 mg/ 10 g was added to sesame oil. Total phenol, antioxidant capacity, power reducing on white tea extract and antioxidant power, peroxide number, oxidation stability and fatty acids profile were measured. All experiments were performed in a completely randomized design with three replications and the means were compared with Duncan's test at the level of ($P<0.05$). SAS V 9.1 software was used for statistical analysis of quantitative data.

Results and Discussion: The results showed that the aqueous extract of white tea contained 4.06 (mg gallic acid per gram of sample) total phenol, 6.00 (µg/ ml) antioxidant capacity 0.020 (mg/ g). Ml) is a reducing power. The reducing power of BHT antioxidant was 40 times and the antioxidant power of BHT was 14.85 times more than the aqueous extract of white tea. In the inhibition of free radicals in sesame oil, the aqueous extract of white tea had a significantly greater effect than the control sample. The iron- containing sample had more oxidation than other samples. In the inhibition of free radicals in sesame oil, the aqueous extract of white tea had a significantly greater effect than the control sample. The iron- containing sample had more oxidation than other samples. Rancimat value for samples of control sesame oil, sesame oil with tea and iron extract, sesame oil with tea and copper extract, sesame oil with tea and zinc extract, sesame oil with tea extract and sesame oil with synthetic antuioxidant BHT respectively 8.79 4.80, 9.08, 9.35, 9.42 and 9.61 hours were measured. The highest stability was related to the sample of sesame oil and synthetic antioxidant BHT and the lowest stability was related to the sample of sesame oil with tea and iron extracts. In comparison with the effect of metals on the oxidation of sesame oil, the addition of iron to sesame oil has increased the oxidation rate compared to the two other examined metals (copper and zinc). Rare metals increase the oxidation rate of

1. Department of Food Science and Technology, Kazeroun branch, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Sabzevar branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
(*Corresponding Author Email: Yazdanpanah2004@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70990.1063

edible oils by increasing the production of free radicals from fatty acids or hydroperoxides. The composition of of fatty acids profile showed that palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid were the predominant fatty acids in sesame oil. In the iron- containing sample, with increasing oxidation rate, the amount of linolenic acid decreased compared to other samples. The results of the Se index were confirmatory on the results of oxidative stability index. White tea extract and sesame oil due to their antioxidant and phenolic compounds have been able to inhibit free radicals and metal peroxidants, especially copper and zinc. Sesame oil extracted by cold pressing is not suitable for frying due to its low heat resistance, but it can be used in the formulation of salad dressings.

Keywords: Antioxidant, Metal catalyst, Oxidative stability, Sesame oil

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 367- 382

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۸۲-۳۶۷

مقاله علمی-پژوهشی

تاثیر عصاره آبی چای سفید بر مقاومت حرارتی روغن کنجد تولید شده با استفاده از پرس سرد

صدیقه یزدان‌پناه[1*]- سارا محمدی[1]- امیرحسین الهامی‌راد[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۹

چکیده

چای سفید در بین انواع چای، به‌عنوان یک ترکیب جدید، حاوی دامنه وسیعی از ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی است. در این مطالعه ابتدا عصاره آبی چای سفید استخراج شد و روغن کنجد با استفاده از پرس سرد تولید گردید. در مرحله بعد، شش نمونه شامل نمونه روغن کنجد (نمونه شاهد)، روغن کنجد حاوی عصاره چای سفید، روغن کنجد حاوی عصاره چای سفید و ۰/۱ پی‌پی‌ام آهن، روغن کنجد حاوی عصاره چای سفید و ۰/۱ پی‌پی‌ام مس، روغن کنجد حاوی عصاره چای سفید و ۰/۱ پی‌پی‌ام روی و روغن کنجد حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام BHT تهیه شد. بررسی فنل کل و قدرت احیاکنندگی بر روی عصاره چای سفید و قدرت آنتی‌اکسیدانی، عدد پراکسید، پایداری اکسایشی و پروفایل اسیدهای چرب بر نمونه‌های حاوی روغن کنجد انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره آبی چای سفید دارای ۴/۰۶ (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم نمونه) فنل کل است. قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان BHT ۴۰ برابر عصاره آبی چای سفید و قدرت آنتی اکسیدان BHT ۱۴/۸۵ برابر، عصاره آبی چای سفید بود. در مهار رادیکال‌های آزاد در روغن کنجد، عصاره آبی چای سفید نسبت به نمونه شاهد به‌صورت معنی داری تاثیر بیشتری داشته است. عصاره چای سفید و روغن کنجد به‌دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنلی قادر به مهار رادیکال‌های آزاد و پراکسیدان‌های فلزی به‌خصوص دو فلز مس و روی بوده‌اند. تاثیر پراکسیدان‌های فلزی بر پروفایل اسیدهای چرب با استفاده از شاخص (Se) پلی-ان (اسیدهای چرب چند غیراشباع/ اسیدهای چرب اشباع) که معیاری از میزان غیراشباعیت است، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های حاوی پراکسیدان‌های فلزی شاخص پلی-ان پایین‌تری نسبت به سایر نمونه‌ها نشان دادند و نمونه روغن کنجد به همراه آهن نسبت به سایر نمونه‌ها، اکسیداسیون بیشتر، پایداری اکسایشی کمتر و کاهش بیشتر اسید لینولنیک را داشته است. اسیدهای چرب غالب روغن کنجد شامل پالمیتیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید و لینولنیک اسید بود. نتایج پایداری حرارتی نشان داد که بالاترین پایداری مربوط به دو نمونه روغن کنجد به همراه BHT (۹/۶۱ ساعت) و روغن کنجد به همراه عصاره چای (۹/۴۲ ساعت) و پایین‌ترین پایداری حرارتی در نمونه روغن کنجد به همراه آهن (۴/۸۱ ساعت) بوده است. نتایج شاخص پلی-ان تاییدی بر نتایج رنسیمت بود. روغن کنجد استخراج شده به‌وسیله پرس سرد به‌دلیل مقاومت حرارتی پایین، مصرف سرخ کردنی ندارد ولی برای استفاده در فرمولاسیون سس‌های سالاد می تواند کاربرد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پایداری اکسیداتیو، روغن کنجد، کاتالیزور فلزی.

مقدمه

کنجد گیاهی یکساله، با نام علمی *Sesamumindicum* L. و از خانواده Pedaliaceae است. کنجد از قدیمی‌ترین دانه‌های روغنی است که توسط انسان شناخته شده است و به‌عنوان یک منبع غذایی استفاده داشته است. کنجد در سرتاسر جهان در درجه اول به‌دلیل تولید روغن کشت می‌شود، با این حال به‌صورت خام و برشته به‌طور گسترده در محصولات قنادی و نانوایی نیز به‌کار می‌رود. ترکیبات ضداکسیداسیون طبیعی مانند سزامول، سزامین و سزامولین سبب پایداری زیاد روغن کنجد در مقابل فساد در اثر اکسیداسیون می‌باشند، ولی در طی حرارت‌دادن و سرخ‌کردن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با حذف رطوبت تجزیه‌شده و کارآیی‌شان کاهش می‌یابد. روغن کنجد نیاز به زمستانه کردن ندارد یا به صورت مختصر زمستانه می‌شود. روغن کنجد یکی از چند روغن نباتی است که می‌تواند مستقیما و بدون تصفیه‌کردن به مصرف برسد (Kochhar, 2000Naseri, 1996).

اکسیداسیون در مواد غذایی یک روند تخریبی است که باعث از بین رفتن ارزش غذایی و تغییرات نامطلوب شیمیایی در آن می‌شود. چربی‌ها و روغن‌ها بسیار مستعد اکسیداسیون هستند و اکسیداسیون باعث تندشدن آن‌ها می‌شود. همچنین محصولاتی که از اکسیداسیون

۱ -گروه علوم و صنایع غذایی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار ، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: Yazdanpanah2004@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70990.1063

چربی‌ها حاصل می‌شوند، می‌توانند اثر منفی بر روی اجزاء دیگر ماده غذایی داشته باشند، به‌طوری که علاوه بر اثرات نامطلوب بر روی خواص حسی مانند عطر و طعم ماده غذایی، باعث از بین‌رفتن ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری و همچنین تولید مواد سمی می شوند. عواملی که سرعت اکسیداسیون را بیشتر تحت تاثیر قرار می-دهند درجه غیراشباعیت، مقدار اکسیژن، دما، نور و حضور فلزات مانند آهن و مس می‌باشند. فلزات کمیاب، سرعت اکسیداسیون روغن‌های خوراکی را با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد از اسیدهای چرب و یا هیدروپراکسیدها افزایش می‌دهند (Yaser et al., 2012).

اثرات سمی مواد آنتی‌اکسیدان شیمیایی از یک طرف و استقبال مصرف‌کنندگان از افزودنی‌های گیاهی به دلیل سازگاری بیشتر با بدن، نداشتن عوارض جانبی آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی مانند TBHQ و قدرت آنتی‌اکسیدانی مناسب از طرف دیگر باعث میل به استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی طبیعی در مواد غذایی شده است (Golluce et al., 2007).

گیاهان و قسمت‌های مختلف آنها مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست از منابع مهم آنتی‌اکسیدان‌ها است که باعث حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش ابتلا به بعضی بیماری‌ها مانند سرطان، بیماریهای قلبی و سکته مغزی است. متابولیت‌های ثانویه گیاهان مانند فنل و فلاونوئید چند عملکردی‌اند و به‌عنوان عوامل احیاکننده، چلاته‌کننده فلزات، و بی‌اثرکننده رادیکال‌های اکسیژن می‌توانند، عمل کنند. این ترکیبات تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو را تحریک می‌کنند و از تولید آنزیم‌های سیکلوژناز در سیستم‌های بیولوژیکی جلوگیری می‌کنند (Mathew and Abraham, 2006). امروزه تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است.

چای از گیاه *Camellia sinensis* (Linn.) برداشت می‌شود. چای سفید، یک ترکیب جدید در بین انواع چای است. برگ‌های این گیاه قبل از باز شدن با کرک‌های سفید رنگ پوشیده شده است، به این علت این نوع چای را چای سفید نام‌گذاری کرده‌اند. چای سفید دارای ترکیبات ضدمیکروبی و ضدسرطانی است. ترکیبات چای سفید شامل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنل‌ها، مواد معدنی، عناصر کمیاب، آمینواسیدها، آنزیم‌ها، لیگنین و متیل‌گزانتین (کافئین، تئوفیلین و تئوبرومین) است. مهم‌ترین فلاوونوئید موجود در چای فلاوونول یا به‌طور دقیق‌تر کاتچین‌ها می‌باشند که دارای اثرات آنتی اکسیدانی هستند (Vinson et al., 1995).

مطالعات مشابهی در زمینه استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی در مواد غذایی و روغن‌ها انجام شده است. Bensmira و همکاران (۲۰۰۷) اثر اسطوخودوس و آویشن را بر مقاومت روغن دانه آفتابگردان در دماهای سرخ‌کردن (۱۵۰، ۱۶۰ و ۱۸۰ درجه سانتی گراد) مورد بررسی قرار دادند و تفاوت‌های معنی‌داری میان نمونه‌های روغن تیمارشده و تیمار نشده ملاحظه شد (Bensmira et al., 2007). آویشن و اسطوخودوس توانایی بالایی را در کاهش مقدار اسیدهای چرب آزاد، عدد پراکسید و ویسکوزیته نشان دادند. به کارگیری اسطوخودوس و آویشن در روغن دانه آفتابگردان باعث افزایش پایداری حرارتی آن شد (Bensmira et al., 2007). Ayadi و همکاران (۲۰۰۹) اثر بعضی از گیاهان معطر مانند رزماری، لیمو، ریحان و آویشن را بر پایداری حرارتی روغن زیتون فوق بکر بررسی کردند. نمونه‌های روغن زیتون در بطری‌های شیشه‌ای قرار گرفته و در دمای ۶۰ و ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقاومت به اکسیداسیون روغن با اندازه‌گیری عدد پراکسید، K232 و K270 (شاخص ترکیبات مزدوج دارای سه باند دوگانه و حضور ترکیبات کربونیلی) و تغییر در مقدار کلروفیل، کاروتنوئید و پلی‌فنول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. افزودن این گیاهان به روغن زیتون باعث افزایش مقاومت حرارتی و پایداری آن شد. میزان اثرگذاری این گیاهان به ترتیب نزولی رزماری>، آویشن>، لیمو> ریحان گزارش شد (Ayadi et al., 2009).

چای سفید سرشار از ترکیبات کاتچین‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات زیست فعال و کافئین است. کافئین اثر سینرژیستی بر کاتچین‌ها دارد. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی قدرت آنتی اکسیدانی و احیاکنندگی عصاره چای سفید و تاثیر عصاره چای سفید بر قدرت آنتی‌اکسیدانی، اکسیداسیون، پایداری اکسایشی و اسیدهای چرب روغن کنجد در حضور عوامل پراکسیدان فلزی متفاوت (آهن، روی و مس) برای ارزیابی تاثیر آنها بر اکسیداسیون در طی کاهش اثرات ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری چای سفید

چای سفید از عطاری محلی شهر شیراز تهیه شد. ابتدا قسمت های مختلف گیاه شامل گل، برگ و ساقه جدا شد، و در سایه و شرایط محیطی (۳۰ –۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲ روز تا رسیدن به رطوبت ۲ درصد خشک گردید. سپس برگ‌ها در آسیاب (ML-320P، پارس خزر، ایران) پودر شد و در ظروف پلی‌اتیلنی (در دمای فریز ۱۸- درجه سانتی‌گراد) بسته‌بندی و دور از رطوبت نگهداری شد (Nazari et al., 2017). چهار گرم نمونه خشک‌شده با ۴۰ میلی‌لیتر آب جوش در یک ارلن مخلوط شد و سپس، در یک اتوکلاو جوش (۲۵ لیتری، آذین، ایران) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خارج کردن نمونه‌ها از اتوکلاو، عصاره‌گیری شدند و تفاله جداسازی شد. تفاله به‌دست آمده با ۶۰

میلی‌لیتر آب جوش مخلوط شد و در اتوکلاو (۱۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه) قرار گرفت. عصاره مرحله اول با عصاره به‌دست‌آمده از تفاله (هر دو عصاره به‌دلیل اینکه پیش تیماری بر آنها صورت نگرفته بود و از حلال آب برای استخراج آنها استفاده شده بود دارای کیفیت یکسانی بودند) مخلوط شد. لایه‌های نازک از عصاره روی پلیت‌های شیشه‌ای (۴۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا خشک شود و به وزن ثابت برسد (Mai et al., 1990).

فنل کل

میزان کل ترکیبات فنلی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عصاره فنلی قبل از تغلیظ و خشک شدن با ۱/۱۶۰ میلی‌لیتر 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 بعد از تکان‌دادن، درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu- UV-1700، ژاپن) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. محلول پایه‌ای از اسید گالیک با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. از محلول پایه غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده سازی شد. طبق مراحلی که برای نمونه توضیح داده شد، مقدار جذب نمونه‌های اسید گالیگ خوانده شد. منحنی استاندارد اسید گالیک رسم شد. معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد تعیین گردید و با قرار دادن مقدار جذب عصاره در آن فنل کل عصاره برحسب معادل میلی-گرم اسید گالیک بر گرم عصاره محاسبه شد (Solimanian et al, 2015).

قدرت احیاکنندگی

محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف ۲۰۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در آب از عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات pH= ۶/۶ و مولاریته ۰/۲ و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰٪ وزنی: حجمی) به نمونه‌ها به‌عنوان متوقف کننده واکنش اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ g سانتریفوژ شدند. از محلول فوقانی پس از سانتریفوژ ۲/۵ میلی‌لیتر به دقت برداشته شد و پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن III (۱ گرم در لیتر) جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش نشان‌دهنده افزایش قدرت احیاکنندگی (آنتی‌اکسیدانی) است (Kumar et al., 2011).

بررسی ویژگی‌های نمونه‌های روغن کنجد

نمونه‌های این پژوهش پس از افزودن فلزات و عصاره به روغن با کمک همزن مغناطیسی به خوبی مخلوط شد (جدول ۱) و جهت آزمون‌ها، آماده‌سازی شد. نمک آلی مس (4-Cyclohexyl butyric acidt capper salt)، نمک آلی آهن ($FeCl_2$) و نمک آلی روی ($ZnCl_2$) به‌عنوان عامل فلزی از شرکت Sigma Aldrich تهیه شد.

جدول ۱- تیمارهای مورد مطالعه

Table 1- The studied treatments

Sample Code کد نمونه	Treatments تیمارها
r	Sesame oil (control sample) روغن کنجد (نمونه شاهد)
ro	Sesame oil contains white tea extract (with a concentration of 6 mg per 10 g) روغن کنجد حاوی عصاره چای سفید (با غلظت ٦ میلی‌گرم بر ۱۰ گرم)
rozn	Sesame oil contains zinc (0.1 ppm) and white tea extract (at a concentration of 6 mg per 10 g) روغن کنجد حاوی روی (۰/۱ پی‌پی‌ام) و عصاره چای سفید (با غلظت ٦ میلی‌گرم بر ۱۰ گرم)
rofe	Sesame oil contains iron (0.1 ppm) and white tea extract (at a concentration of 6 mg per 10 g) روغن کنجد حاوی آهن (۰/۱ پی‌پی‌ام) و عصاره چای سفید (با غلظت ٦ میلی‌گرم بر ۱۰ گرم)
rocu	Sesame oil contains copper (0.1 ppm) and white tea extract (at a concentration of 6 mg per 10 g) روغن کنجد حاوی مس (۰/۱ پی‌پی‌ام) و عصاره چای سفید (با غلظت ٦ میلی‌گرم بر ۱۰ گرم)
rbht	Sesame oil contains 100 mg per liter of BHT روغن کنجد حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر BHT

اندازه‌گیری عدد پراکسید

برای اندازه‌گیری عدد پراکسید حدود ۳ گرم از روغن در ارلن مایر به دقت وزن گردید. سپس ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط اسید استیک و کلروفرم به آن افزوده شد و کاملا حل گردید. در مرحله بعد ۰/۵ میلی لیتر محلول اشباع شده یدور پتاسیم به آن اضافه گردید و به مدت یک دقیقه در تاریکی قرار داده شد. پس از این مدت ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و محلول با تیوسولفات سدیم ۰/۰۰۱ نرمال در حضور معرف نشاسته تیتر و مقدار عدد پراکسید با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Mimica- Dukic et al., 2003).

(۱) ۱۰۰× (وزن مونه (گرم)/ ۰/۰۰۱×مقدار تیوسولفات مصرفی (میلی‌لیتر)) =عدد پراکسید

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد)

برای ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد) ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه، با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول DPPH متانولی DPPH نیز در غلظت ۲×۱۰^{-۴} مولار در لوله آزمایش مخلوط و با همزن به خوبی یکنواخت شد. نمونه‌های آماده شده به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در محیط تاریک نگهداری شدند. پس از گذشت ۱ ساعت، جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (Shimadzu- UV-1700، ژاپن) در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر، درصد بازدارندگی محاسبه گردید (Mimica- Dukic et al., 2003). به‌منظور ارزیابی بهتر توانایی مهارکنندگی نمونه از شاخص IC50 استفاده شد. این شاخص بیانگر غلظتی از نمونه است که قادر به مهارکردن ۵۰ درصد رادیکال آزاد اولیه است.

(۲) ۱۰۰ ×(جذب شاهد /جذب نمونه –جذب شاهد) =بازدارندگی (درصد)

آزمون رنسیمت

این آزمون با دستگاه رنسیمت (Metrohm، مدل ۷۴۳) انجام گردید. مقدار ۲/۵ تا ۳ گرم نمونه از مرکز نمونه همگن و یکنواخت شده با استفاده از یک پی‌پت با دقت برداشته شد و درون لوله واکنش ریخته شد. با استفاده از پی‌پت مدرج به میزان ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده (آب رنسیمت) در لوله اندازه‌گیری ریخته شد و لوله های اندازه‌گیری در محل‌های مشخص در دستگاه قرار داده شدند. جریان هوایی معادل ۲۰ لیتر هوا بر ساعت برای هر لوله واکنش در دستگاه در نظر گرفته شد و درجه حرات دستگاه برای هر نمونه روغن سه مرتبه جداگانه بر روی دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد ثابت شد، بعد از گرم‌شدن دستگاه و رسیدن به دمای تنظیم شده، لوله‌های واکنش در محل مشخص در دستگاه قرار داده شد. بعد از گذشت مدت زمانی که متناسب با نوع نمونه مورد آزمایش است، نتایج پایداری اکسایشی به‌طور خودکار بر حسب دوره القایی گزارش گردید (Farhoosh and Hoseini, 2014).

شناسایی پروفایل اسیدهای چرب

آماده‌سازی متیل‌استر اسیدهای چرب طبق روش ISO به شماره ۵۵۰۹ انجام شد. مقدار ۴ گرم از روغن خشک و شفاف داخل بالن سرسمباده توزین و ۴۰ میلی‌لیتر متانول و ۰/۵میلی‌لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم متانولی را به آن افزوده و مدت ۳ دقیقه هوای داخل بالن به‌وسیله گاز ازت خارج و تا نقطه جوش حرارت داده شد تا محلول کاملا شفاف گردید. مدت زمان لازم برای استریفیه شدن ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. پس از پایان واکنش بالن زیر آب سرد خنک شد و محتویات آن به قیف جداکننده منتقل شد. بالن با ۲۰ میلی‌لیتر هپتان شستشو و به قیف جداکننده اضافه گردید. سپس، ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و پس از همزدن اجازه داده شد که دو فاز از هم جدا گردد. محتویات قیف جداکننده مجددا با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد. فاز محتوی حلال از سولفات سدیم خشک، فیلتر شد. متیل‌استر تهیه شده آماده جهت تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی آماده شد (ISO, 1978).

برای اندازه‌گیری پروفایل اسیدهای چرب، از دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل BPX 70 ساخت شرکت SGE استرالیا، مجهز به ستون با طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میکرومتر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر و شناساگر FID 1075 system استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه روغن با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۵ درصد استیل کلراید در متانول مخلوط و به مدت یک ساعت در آون ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه کامل مخلوط گردید و در ادامه، ۱ میلی‌لیتر هگزان به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه به‌طورکامل مخلوط شد. سپس، ۱ میلی لیتر هگزان به آن اضافه و بعد به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی-گراد و ۴۰۰۰ g سانتریفوژ (ALC- 4232، آمریکا) شد. دمای دستگاه در طول فرایند به‌صورت ثابت ۱۹۸ درجه سانتی‌گراد بود. سرعت جریان گاز حامل (هلیوم) ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و روش تزریق به GCبه صورت Split بود (Sjovall et al., 2000).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام گرفته و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام

گرفت. در بررسی پروفایل اسیدهای چرب مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۱ درصد انجام گرفت. رسم منحنی‌ها با نرم‌افزار Excel انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های کمی از نرم افزار SAS V 9.1 استفاده شد.

نتایج و بحث

فنل کل

در جدول ۲ میزان فنل کل و میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سفید در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT نشان داده شده است. میزان فنل کل ۴/۰۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم نمونه در عصاره چای سفید اندازه‌گیری شد. Rohadi و همکاران (۲۰۱۹) برای تعیین ترکیبات فنلی چای سفید از حلال‌های مختلف ان-هگزان، اتیل‌استات و اتانول استفاده کردند و میزان ترکیبات فنلی را به‌ترتیب ۲۲/۴، ۵۷/۵۴ و ۵۹/۳۲ درصد گزارش دادند (Rohadi et al., 2019). Widyasanti و همکاران (۲۰۱۶) از حلال آب برای اندازه-گیری ترکیبات فنلی چای سفید در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده کردند و میزان ترکیبات فنلی را ۰/۲۵± ۱۸/۵۶ (گرم اسید گالیک / ۱۰۰) گزارش دادند (Widyasanti et al., 2016). Shariatifar و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه علف هیضه، میزان ترکیبات فنلی تام عصاره های آبی، اتانولی و متانولی را به‌ترتیب ۲۷/۲، ۲۶ و ۲۵/۹۱ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم نمونه گزارش کرده‌اند (Shariatifar et al., 2012). در پژوهش حاضر نسبت به پژوهش‌های عنوان شده میزان فنل کل کمتری گزارش شده است.

قدرت احیاکنندگی

میزان قدرت احیاکنندگی عصاره چای سفید ۰/۰۲۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره) و BHT برابر با ۰/۸۰۳ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره) اندازه‌گیری شد. این نتایج نشان می‌دهد قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی ۴۰ برابر بیشتر از عصاره چای سفید است. قدرت آنتی‌اکسیدان سنتزی ۱۴/۸۵ برابر بیشتر از عصاره چای سفید است که تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان دادند. آزمون قدرت احیاکنندگی روشی است که به‌صورت مستقیم آنتی‌اکسیدان‌ها و احیاکننده‌ها را در نمونه‌ها اندازه‌گیری می‌کند و رابطه خطی با غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها دارد (Rohadi et al., 2019). با افزایش مقدار ترکیبات فنلی در عصاره، قدرت احیاکنندگی به‌واسطه اهدای تعداد بیشتری الکترون و یا اتم‌های هیدروژن افزایش می‌یابد و واکنش‌های زنجیری اکسیداسیون متوقف ویا به تاخیر می‌افتد. Mirzaei و همکاران (۲۰۱۱) توان احیاکنندگی عصاره‌های هیدروالکلی خاکشی (۰/۰۵± ۰/۴۴)، بارهنگ (۰/۲± ۱/۲۶)، زنیان (۰/۰۲± ۰/۴۸)، گشنیز (۰/۰۵± ۰/۳۱) و شنبلیله (۰/۰۵± ۰/۴۵) را بر حسب میکرو مول آهن در میلی‌گرم وزن خشک عصاره تعیین کردند (Mirzaei et al., 2011). در پژوهش حاضر نسبت به پژوهش عنوان شده میزان توان احیاکنندگی کمتری گزارش شده است.

جدول ۲- میزان فنل کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی عصاره چای سفید

Table 2- Total phenol content, antioxidant capacity and regenerative power of white tea extract

Test آزمون	BHT	White tea extract عصاره چای سفید
Total phenol (equivalent to mg of gallic acid per gram of extract) فنول کل (معادل میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره)	-	4.06± 0.113
Regenerative power قدرت احیاکنندگی	0.803± 0.015^{A}	0.020± 0.002^{B}

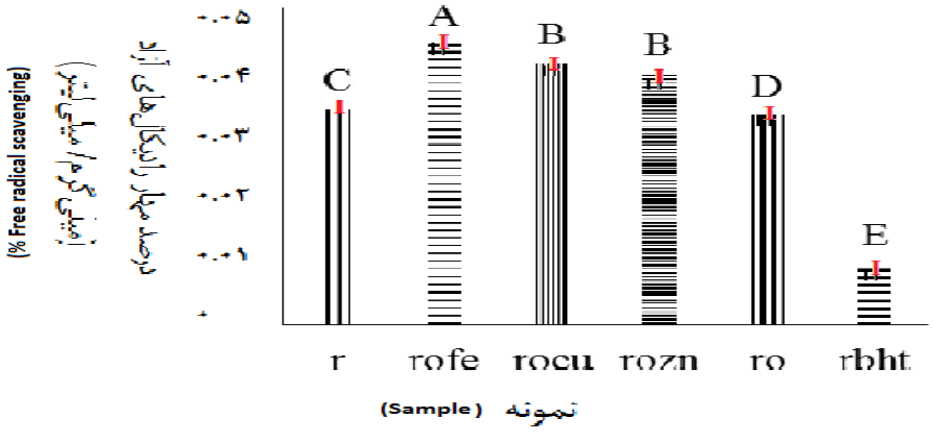
حروف متفاوت، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ در ردیف را نشان می‌دهد.

Different letters show a significant difference at the 5% level in the row.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد)

IC50، غلظت مورد نیاز عصاره برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد می‌باشد و پارامتر مهمی برای مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره های مختلف است. هرچه خاصیت ضداکسایشی ماده‌ای بیشتر باشد، غلظت مورد نیاز آن برای مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد کمتر است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف ناشی از توانایی آن‌ها در دادن اتم هیدروژن یا الکترون برای مهار رادیکال‌های آزاد است (Burits and Bucar, 2000). میزان عدد IC50 (شکل ۱) نمونه روغن کنجد (شاهد)، روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن، روغن کنجد به همراه عصاره چای و مس، روغن کنجد به همراه عصاره چای و روی، روغن کنجد به همراه عصاره چای و روغن کنجد به همراه آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به‌ترتیب ۰/۰۳۴، ۰/۰۴۴، ۰/۰۴۱،

۰/۰۳۹، ۰/۰۳۲ و ۰/۰۰۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت معنی‌دار در سطح ۵ درصد مربوط به روغن کنجد به همراه آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT است، بنابراین اضافه کردن ترکیب آنتی‌اکسیدانی به روغن کنجد باعث افزایش پایداری آن می‌شود و کمترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن است. نتایج نشان می‌دهد افزودن آهن باعث افزایش سرعت اکسیداسیون شده است و عدد IC50 را به‌صورت معنی‌دار در سطح ۵ درصد افزایش داده است و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن را نسبت به سایر نمونه‌ها کاهش داده است. نمونه‌های حاوی پراکسیدان‌های فلزی نسبت به نمونه شاهد و نمونه روغن کنجد به همراه عصاره چای فعالیت آنتی‌اکسیدانی را بسیار کاهش داده‌اند. نمونه دارای عصاره آبی چای سفید نسبت به نمونه دارای BHT ضعیف‌تر عمل کرده است. عصاره‌های آبی به علت محتوای پایین ترکیبات فنولی، خاصیت ضداکسایشی کم‌تری را نسبت به دیگر عصاره‌ها (اتانولی و متانولی) دارند (Wanasundara and Shahidi, 2005). میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در نمونه حاوی روغن به میزان ترکیبات ضداکسایشی موجود در آن به‌خصوص ترکیبات فنلی بستگی دارد و هرچه میزان این ترکیبات بیشتر باشد فعالیت آنتی-اکسیدانی بالاتر خواهد بود. برای مثال بالا بودن میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی انواع گونه‌های پونه کوهی به علت بالا بودن میزان کارواکرول و تیمول در آن‌ها است (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013). Hajiaghaalipour و همکاران (۲۰۱۵) برای بررسی مهار رادیکال آزاد DPPH، IC50 (میکروگرم/ میلی‌لیتر) چای سفید از آب داغ استفاده کردند و بالاترین قدرت و فعالیت را نسبت به چای سبز و چای سیاه برای چای سفید (۴/۹ ±۹۹/۹ درصد) گزارش کردند (Hajiaghaalipour et al., 2015). Shariatifar و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی-اکسیدانی گیاه علف هیضه، غلظت مهار ۵۰ درصد (IC50) عصاره اتری را ۰/۲ ±۹/۹ گزارش کرده‌اند (Shariatifar et al., 2012). در پژوهش حاضر نسبت به پژوهش‌های عنوان شده میزان مهارکنندگی کمتری گزارش شده است.



شکل ۱- فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های روغن کنجد حاوی عصاره چای و پراکسیدان‌های فلزی آهن، مس و روی

Fig. 1. Antioxidant activity of sesame oil samples containing tea extract and metal peroxidants of iron, copper and zinc

حروف متفاوت، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد. آزمون در سه تکرار انجام شده است (r: نمونه روغن کنجد (شاهد)، rofe: روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن، rocu: روغن کنجد به همراه عصاره چای و مس، rozn: روغن کنجد به همراه عصاره چای و روی، ro: روغن کنجد به همراه عصاره چای، rBHT: روغن کنجد به همراه BHT).

Different letters show a significant difference at the 5% level. The test was performed in three replications (r: sesame oil sample (control), rofe: sesame oil with tea and iron extract, rocu: sesame oil with tea and copper extract, rozn: sesame oil with tea and zinc extract, ro: sesame oil with tea extract, rBHT: sesame oil with BHT).

عدد پراکسید نمونه‌های روغن کنجد حاوی عصاره چای و پراکسیدان‌های فلزی آهن، مس و روی

عدد پراکسید یکی از پارامترهای اندازه‌گیری فساد روغن، برای تضمین پایداری اکسیداتیو روغن است و میزان کل هیدروپراکسیدها که از ترکیبات اولیه فرایند اکسیداسیون روغن‌ها است را نشان می دهد. شکل ۲ عدد پراکسید نمونه‌های روغن کنجد را نشان می‌دهد. میزان عدد پراکسید نمونه‌های روغن کنجد در روز اول تولید ۰/۳۵ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن اندازه‌گیری شد. میزان عدد پراکسید نمونه روغن کنجد شاهد، روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن، روغن کنجد به همراه عصاره چای و مس، روغن کنجد به همراه عصاره چای و روی، روغن کنجد به همراه عصاره چای و روغن کنجد به همراه آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بعد از ۷ روز

نگهداری در دمای محیط به‌ترتیب ۲/۱۳، ۲/۵۱، ۲/۳۹، ۲/۳۴، ۲/۰۱ و ۱/۴۳ میلی‌اکی‌والان اکسیژ بر کیلوگرم روغن اندازه‌گیری شد. افزودن فلزات به روغن کنجد حاوی عصاره چای سفید به‌خصوص آهن نسبت به فلزات مس و روی باعث افزایش سرعت اکسیداسیون روغن و عدد پراکسید به‌صورت معنی‌دار در سطح ۵ درصد نسبت به سایر نمونه‌ها شده است. نمونه روغن کنجد حاوی عصاره چای نسبت به نمونه شاهد باعث کاهش اکسیداسیون شده است. در مقایسه نمونه‌ها بیشترین جلوگیری از اکسیداسیون را نمونه حاوی BHT به صورت معنی‌دار در سطح ۵ درصد نشان داده است.

عواملی که سرعت اکسیداسیون را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهند شامل درجه غیراشباعیت، مقدار اکسیژن، دما، نور و حضور فلزات به طور عمده انتقال فلزات مانند آهن و مس هستند (Yaşar et al., 2012). فلزات کاتالیزورهای بسیار قوی در واکنش‌های اکسیداسیون می‌باشند، سرعت اکسیداسیون روغن‌های خوراکی را با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد از اسیدهای چرب و یا هیدرو پراکسیدها افزایش می‌دهند (Yaşar et al., 2012).

رادیکال‌های آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌ها با دو مکانیسم اصلی غیرفعال می‌شود. اولین مکانیسم، روش وابسته به انتقال هیدروژن است که در آن ماده آنتی‌اکسیدان با انتقال اتم هیدروژن به رادیکال آزاد باعث غیرفعال شدن آن در محیط می‌شود (رابطه ۱).

$$X^0 + AH \longrightarrow XH + A^0 \qquad (۱)$$

مکانیسم دوم، روش وابسته با انتقال تک الکترون است. در این روش آنتی‌اکسیدان با انتقال تک الکترون به رادیکال آزاد، فلزات و یا گروه‌های کربونیل در محیط واکنش، عملکرد خود را انجام می دهد (رابطه ۲ تا ۵). عوامل چلاته کننده با فلزات پیوند می‌دهند و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان ثانویه عمل می‌کنند (Huang et al., 2005).

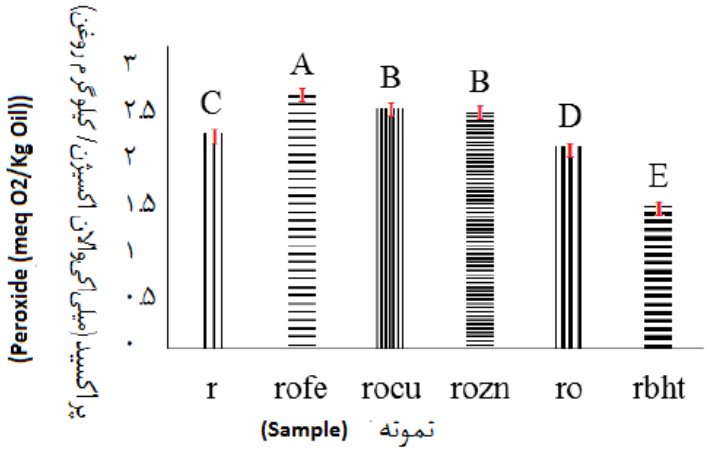
$$X^0 + AH \longrightarrow X^- + AH^+ \qquad (۲)$$

$$AH^0 + H_2O \longrightarrow A0 + H_3O^+ \qquad (۳)$$

$$X^- + H3O^+ \longrightarrow XH + H_2O \qquad (۴)$$

$$M(III) + AH \longrightarrow AH^+ + M(II) \qquad (۵)$$

X^0= رادیکال آزاد، AH= آنتی‌اکسیدان، M=فلز.



شکل ۲- عدد پراکسید نمونه‌های روغن کنجد حاوی عصاره چای و پراکسیدان‌های فلزی آهن، مس و روی بعد از ۷ روز نگهداری در دمای محیط

Fig. 2. Peroxide number of sesame oil samples containing tea extract and metal peroxidants of iron, copper and zinc after 7 days of storage at room temperature

حروف متفاوت، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد. آزمون در سه تکرار انجام شده است (r: نمونه روغن کنجد (شاهد)، rofe: روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن، rocu: روغن کنجد به همراه عصاره چای و مس، rozn: روغن کنجد به همراه عصاره چای و روی، ro: روغن کنجد به همراه عصاره چای، rBHT: روغن کنجد به همراه BHT).

Different letters show a significant difference at the 5% level. The test was performed in three replications (r: sesame oil sample (control), rofe: sesame oil with tea and iron extract, rocu: sesame oil with tea and copper extract, rozn: sesame oil with tea and zinc extract, ro: sesame oil with tea extract, rBHT: sesame oil with BHT).

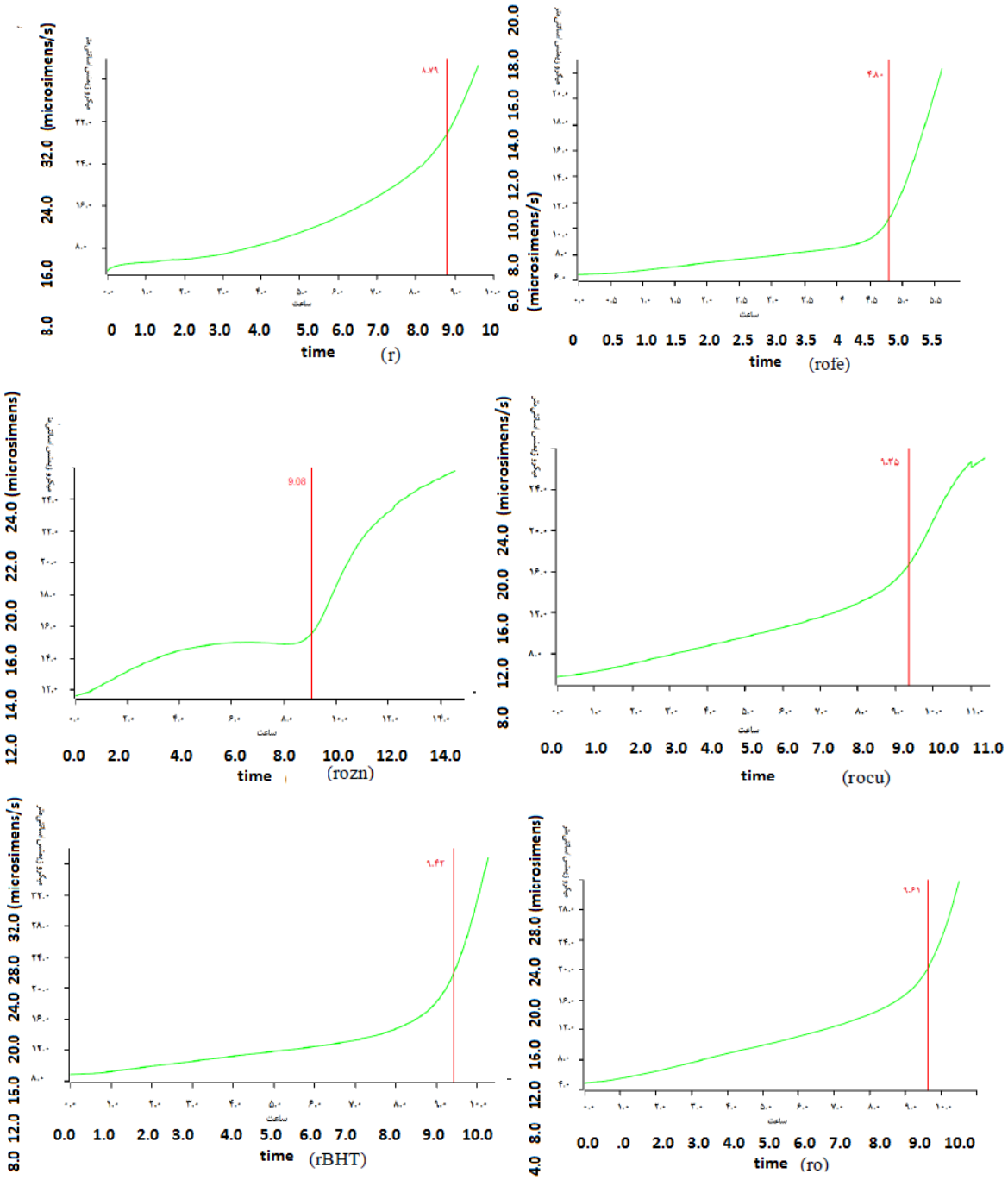
اسیدهای چرب اشباع نشده موجود در روغن می‌تواند پیوندهای دوگانه و اکسیژن را جذب کرده و پراکسید تولید کنند. این پراکسید به شدت فعال هستند و قادر است ید موجود در یدید پتاسیم را آزاد کند، مقدار ید آزاد شده را می‌توان با تیوسولفات سدیم اندازه‌گیری کرد

(AOCS, 2009). Noël و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دو نوع روغن کنجد پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد میزان عدد پراکسید در نمونه روغن سفید و روغن قهوه‌ای به‌ترتیب ۱/۳۱ و ۱/۸۳ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن است (Noël et al., 2016). Ukaan و Ogbonna (۲۰۱۳) بر روی ترکیبات شیمیایی ۱۳ دانه کنجد محلی کشور نیجریه و خصوصیات کیفی روغنهای آنها مطالعه کردند. از نظر میزان روغن، رطوبت، پروتئین وسایر موارد با هم تفاوت داشتند. عدد پراکسید آنها در محدوده ۱-۷/۶ میلی‌اکی والان در گرم روغن اندازه‌گیری شد که تقریبا تمامی آنها در گستره استاندارد کدکس (۵ میلی‌اکی والان در کیلوگرم روغن) قرار داشتند (Ukaan and Ogbonna; 2013). Gouveia و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که اندیس پراکسید روغن کنجد خام ۸/۹۹ میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم روغن می‌باشد (Gouveia et al., 2017). میزان اعداد پراکسید گزارش شده در پژوهش حاضر نیز در محدوده استاندارد کدکس (Codex, 2005) و ایران (۵ میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم روغن (INSO, 13392) قرار دارد و مشابه پژوهش‌های عنوان شده است.

زمان پایداری اکسایشی (آزمون رنسیمت) نمونه‌های روغن کنجد حاوی عصاره چای و پراکسیدان‌های فلزی آهن، مس و روی

شکل ۳ پروفایل رنسیمت (زمان پایداری اکسایشی) نمونه‌های روغن کنجد حاوی عصاره چای سفید و فلزات آهن، مس و روی را نشان می‌دهد. در روش رنسیمت تغییر در مقاومت اکسایشی روغن‌ها، تعیین پایداری روغن و مقایسه درجه تخریب روغن‌ها در طی حرارت‌دهی قابل اندازه‌گیری است. نقطه عطف منحنی اکسیداسیون به‌عنوان دوره القاء و طول این نقطه به‌عنوان پایداری اکسیداتیو روغن تعیین می‌شود (Abdel-Razek et al., 2011). عدد رنسیمت نمونه روغن کنجد شاهد، روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن، روغن کنجد به همراه عصاره چای و مس، روغن کنجد به همراه عصاره چای و روی، روغن کنجد به همراه عصاره چای و روغن کنجد به همراه آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به‌ترتیب ۸/۷۹، ۴/۸۰، ۹/۰۸، ۹/۳۵، ۹/۴۲ و ۹/۶۱ ساعت اندازه‌گیری شد. بیشترین پایداری مربوط به نمونه روغن کنجد و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و کم‌ترین پایداری مربوط به نمونه روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن است. در مقایسه اثرگذاری فلزات بر اکسایش روغن کنجد، افزودن آهن به روغن کنجد باعث افزایش سرعت اکسیداسیون نسبت به دو فلز مس و روی شده است و به‌صورت معنی‌دار در سطح ۵ درصد میزان عدد رنسیمت را به شدت کاهش داده است. طبق استاندارد ملی ایران شماره ۵۹۵۰ حداقل مقدار پایداری رنسیمت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد ۱۲ساعت می‌باشد (ISIRI, 5950). Farmani و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود بر نمونه‌های روغن کنجد تهیه‌شده با پرس سرد در منطقه مازندران، پایداری اکسایشی را در محدوده ۵/۹ -۱۰/۲ ساعت گزارش کردند و بیان کردند که روغن‌های استخراجی برای پخت‌وپز و سرخ کردن غیرمطلوب می باشند (Farmani et al., 2019). پایداری اکسیداتیو روغن‌های کنجد تهیه شده در کارخانه ۱۷/۱۷ ساعت است که مناسب مصرف خانگی و حرارت‌دهی است.

فلز مس پایداری به اکسایش روغن کنجد را نسبت به فلز روی بیشتر کاهش داده است. وجود ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی در عصاره چای و روغن کنجد نسبت به نمونه شاهد تا حدی از شروع اکسیداسیون جلوگیری کرده است و توانسته تاثیر مهارکنندگی بیشتری نسبت به آهن بر دو فلز مس و روی داشته باشد. آنتی اکسیدان‌ها می‌تواند غلظت فلزات را که تسریع کننده پراکسیداسیون لیپید می‌باشند، با مهار تشکیل رادیکال‌های آزاد و صدمات ناشی از آنها کاهش دهد. در میان فلزات، آهن به دلیل فعالیت بالای خود به‌عنوان یکی از مهم‌ترین پراکسیدان‌های اکسیدکننده چربی شناخته شده است (Tynek et al., 2012). وجود فلزات سنگین در روغن نه تنها برای سلامت مصرف‌کننده مضر است، بلکه با ایفای نقش کاتالیزوری در مرحله آغازین از واکنش‌های اکسایشی روغن، تشکیل رادیکال‌های آزاد را در آن تسریع می‌کند (Akbari-Adergani et al., 2015). به‌دلیل نوع پیوندهای متفاوتی که بین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سفید و ترکیبات فلزی متفاوت در روغن کنجد ایجاد شده است و پتانسیل اکسیداسیون و احیای متفاوت ترکیبات فلزی، تاثیر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سفید در روغن کنجد در مهار رادیکال‌های آزاد فلزی متفاوت بوده است. حضور فلزات در روغن‌های گیاهی به علت عوامل درون‌زا و برون‌زا است. عوامل درون‌زا در ارتباط با متابولیسم گیاه است. عوامل برون‌زا در ارتباط با آلودگی خاک، کوددهی، تکنیک‌های زراعی تولید، جمع‌آوری دانه‌ها در طول فرایندهای استخراج، رنگبری، تصفیه و بی‌بوکردن و یا با آلودگی تجهیزات فرآوری فلزی، مواد بسته‌بندی و ذخیره‌سازی می‌باشد (Farzin and Moassesi, 2014).



شکل ۳- پروفایل رنسیمت نمونه‌های روغن کنجد حاوی عصاره چای و پراکسیدان‌های فلزی آهن، مس و روی

Fig. 3. Rank profile of sesame oil samples containing tea extract and metal peroxidants of iron, copper and zinc

آزمون در سه تکرار انجام شده است (r: نمونه روغن کنجد (شاهد)، rofe: روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن، rocu: روغن کنجد به همراه عصاره چای و مس، rozn: روغن کنجد به همراه عصاره چای و روی، ro: روغن کنجد به همراه عصاره چای، rBHT: روغن کنجد به همراه BHT).

The test was performed in three replications (r: sesame oil sample (control), rofe: sesame oil with tea and iron extract, rocu: sesame oil with tea and copper extract, rozn: esesam oil with tea and zinc extract, ro: sesame oil with tea extract, rBHT: sesame oil with BHT).

پایداری اکسیداتیو قابل توجه روغن کنجد به دلیل وجود مواد غیرصابونی‌شونده لیگنانی در آن است. ترکیبات قوی آنتی‌اکسیدانی در روغن دانه کنجد شامل سزامول، سزامولین (پیش‌ساز آنتی‌اکسیدانی)، سزامول، سزامینول و ایزومرهای آن، است. محققین

نشان داده‌اند که، از سزامولین تحت شرایط بدون آب و در حضور یک اسید به‌وسیله انتقال بین ملکولی، سزامینول و ایزومرهای مرتبط با آن تشکیل می‌شوند. در طی حرارت دادن و سرخ کردن در حضور رطوبت، سزامولین از طریق پروتونولیز به سزامول تجزیه می‌شود و یون اکسونیوم تشکیل می‌شود و زمانی که طی حرارت دادن رطوبت از بین می‌رود، این ترکیبات جهت تشکیل سزامینول و ایزومرهای مرتبط، در محل کربن شماره ۲ با پیوند کربن-کربن از طریق انتقال بین‌مولکولی باند می‌شوند (Kochhar, 2000). کاتچین‌های مهم در چای سفید شامل اپی‌کاتچین، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین -۳ -گالات و اپی‌گالوکاتچین-۳ -گالات که گالات‌های فلاونول می‌باشند. غلظت این ترکیبات فنولی در چای سفید بیشتر از چای سبز است (Ortsater et al., 2012). افزایش غلظت ترکیبات فنلی به‌طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می دهد. توانایی مهارکنندگی فنل‌ها به دلیل گروه‌های هیدروکسیل (OH) و گروه‌های قابل تعویض متوکسی (OCH3) در مولکول‌ها است. ترکیبات فنولیک قادرند تا یک اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد بدهند و بدین ترتیب باعث توقف پیشروی واکنش زنجیری در طی فرآیند اکسیداسیون چربی شوند (Cai et al., 2006).

Amini و همکاران (۲۰۱۵) به ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه مرزه بر روغن کلزا و ماهی پرداختند، نتایج آزمون رنسیمت این تحقیق نشان داد افزودن اسانس مرزه به روغن کلزا و ماهی باعث کاهش سرعت اکسیداسیون و افزایش زمان دوره القا می‌شود (Amini et al., 2015). Safari و همکاران (۲۰۱۶) به ارزیابی اثر آنتی اکسیدانی عصاره کنجاله روغن‌کشی شده کنجد جهت پایدارسازی روغن‌های خوراکی پرداختند. روند تغییرات طول دوره القاء در تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/01$) به‌طوری که بعد از گذشت ۴۸ ساعت بیشترین طول دوره القاء مربوط به تیمار اسید گالیک (۵ ساعت و ۳۰ دقیقه) و سپس تیمار عصاره ۵۰ پی‌پی‌ام (۳ ساعت و ۵۰ دقیقه) و بعد از آن شاهد (۳ ساعت و ۳۰ دقیقه) بود. نتایج نشان داد که عصاره متانولی کنجاله کنجد در غلظت‌های پایین‌تر اثر محافظت کنندگی بیشتری در روغن سویا داشت. با افزایش زمان اسیدهای چرب به پراکسیدها و پراکسیدها به ترکیبات ثانویه اکسیداسیون تبدیل می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها تاثیر بازدارنده بر روی افزایش اندیس اسیدی در طی زمان دارند، زیرا مکانیسم عمل به دلیل ساختمان شیمیایی آنها، بیشتر از طریق احیاء رادیکالهای آزاد می‌باشد. با افزایش زمان آنتی‌اکسیدان‌ها کارآیی خود را از دست می‌دهند و نقشی در جلوگیری از هیدرولیز اسیدهای چرب نخواهند داشت (Safari et al., 2016). نتایج مشابهی در پژوهش حاضر به‌دلیل استفاده از عصاره چای سفید نسبت به نمونه شاهد گزارش شده است. کارآیی آنتی-اکسیدان‌ها برای جلوگیری از کسیداسیون چربی به مقاومت حرارتی آنها و دوره القای آنها در محیط بستگی دارد که تا چه مدت زمانی بتواند ۹۰ درصد کارآیی خود را حفظ کند. با افزایش دما و حضور پراکسیدان‌های فلزی دوره القا به صورت لگاریتمی کاهش می‌یابد (Abou-Gharbia et al., 2000).

پروفایل اسیدهای چرب

تاثیر پراکسیدان‌های فلزی بر پروفایل اسیدهای چرب با استفاده از شاخص (Se) پلی-ان که معیاری از میزان غیراشباعیت است، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی پروفایل اسیدهای چرب (جدول ۳) نشان می‌دهد که اسیدهای چرب پالمیتیک، استئاریک، اولئیک، لینولئیک و لینولنیک، اسیدهای چرب اصلی روغن کنجد می‌باشند. در تمامی نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین اسیدهای چرب تعیین گردید. اسید چرب اولئیک مقاوم در برابر اکسیداسیون نسبت به سایر اسیدهای چرب غیراشباع است و بیشترین مقدار آن در نمونه روغن کنجد به همراه BHT تعیین گردید. اسید چرب لینولئیک بیشترین مقدار را بین اسیدهای چرب به‌خود اختصاص داد و بیشترین مقدار آن در نمونه روغن کنجد به همراه BHT و نمونه روغن کنجد به همراه عصاره چای تعیین گردید. اسید چرب لینولنیک کمترین مقدار را بین اسیدهای چرب به‌خود اختصاص داد و بیشترین مقدار آن در نمونه روغن کنجد (شاهد) گزارش شد. رایج‌ترین اسیدچرب اشباع در روغن گیاهی و حیوانی پالمیتیک اسید می‌باشد و بیشترین مقدار آن در نمونه روغن کنجد (شاهد) گزارش شد. بیشترین مقدار اسید استئاریک در نمونه روغن کنجد به همراه آهن تعیین گردید. در میان اسیدهای چرب تک غیراشباعی، اولئیک اسید عمده‌ترین اسیدچرب در روغن‌های گیاهی و حیوانی می‌باشد. لینولئیک اسید و آلفالینولنیک اسید به‌عنوان اسیدهای چرب ضروری شناخته می‌شوند و از اهمیت بالایی در رژیم غذایی برخوردار هستند، زیرا این اسیدهای چرب توسط بدن سنتز نمی‌شوند و بایستی از طریق رژیم غذایی تامین شوند. در بررسی پروفایل اسیدهای چرب و بررسی اثر اکسیداسیون روی نمونه‌ها، اسیدهای چرب با سه پیوند دوگانه و بیشتر، تاثیرپذیرترین ترکیبات در برابر اکسیداسیون می‌باشند. کیفیت، پایداری اکسایشی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ارزش‌های تغذیه‌ای روغن استخراجی با بررسی ساختار اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده تری گلیسریدها امکان‌پذیر است. از شاخص‌های MUFA (شاخص اولئیک اسید، اسید چرب تک غیراشباع)، PUFA (شاخص اسید لینولئیک، اسید چرب چند غیراشباع)، SFA (شاخص پالمیتیک اسید، اسید چرب اشباع)، برای ارزیابی کامل اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده

یک نوع روغن استفاده می‌شود. درصد ایده‌آل پایداری روغن و تمایل روغن به واکنش‌های اکسایشی با استفاده از شاخص پلی-ان که معیاری از میزان غیراشباعیت (Se= PUFA/ SFA) است، برآورد می‌شود. اکسیداسیون در دمای پایین منجر به تولید هیدروپراکسیدها می‌شود، ترکیبات غیراشباع کاهش نمی‌یابد و اسید اولئیک حفظ و افزایش می‌یابد. اکسیداسیون در دمای بالا باعث اشباع شدن پیوندهای دوگانه می‌شود و اسید پالمیتیک و اسید لینولئیک حفظ و افزایش می‌یابد (Molodi et al., 2016).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری اسیدهای چرب پالمیتیک، استئاریک، اولئیک، لینولئیک و لینولنیک تفاوت معنی‌داری را در نمونه‌های مورد مطالعه نسبت به یکدیگر و در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد (جدول ۳). تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد در مقایسه شاخص Se در نمونه‌ها تعیین گردید که مشابه روند پایداری اکسایشی حاصل از رنسیمت است. پایین‌ترین مقدار شاخص Se در نمونه حاوی آهن و بالاترین مقدار در نمونه حاویBHT تعیین شد. نمونه‌های حاوی پراکسیدان‌های فلزی شاخص Se پایین‌تری نسبت به سایر نمونه‌ها داشتند. افزودن آهن باعث افزایش سرعت اکسیداسیون شده و میزان اسید چرب لینولنیک را نسبت به سایر نمونه‌ها کاهش داده است. سرعت اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد بیشتر از اسیدهای چرب موجود در ساختار تری گلیسیریدها است. در طی تولید روغن کنجد با استفاده از پرس سرد میزان اسیدهای چرب آزاد نسبت به روش صنعتی بیشتر است ولی در روش صنعتی به‌دلیل مراحل تصفیه و بوگیری آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از بین می‌روند و اضافه‌کردن آنتی اکسیدان‌های سنتزی نیز این کمبود را پایداری روغن نمی‌تواند جبران کند. در حالی که در روغن کنجد تولیدی به‌وسیله پرس سرد پوست دانه که حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (گاما-توکوفرول) است، حفظ می‌شود و پایداری اکسایشی روغن افزایش می‌یابد (Molodi et al., 2016). Dini Torkamani و همکاران (۲۰۰۷) به بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مهم دانه در ده رقم کنجد پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین ترکیب پنج اسیدچرب مهم شامل پالمیتیک، استئاریک، اولئیک، لینولئیک و لینولنیک به‌ترتیب به میزان ۸/۹۹، ۵/۹۸، ۴۴/۴۷، ۳۹/۶۹ و ۰/۸۷ درصد می‌باشد (Dini Torkamani and Karaptyan, 2007). Gouveia و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای که بر پروفایل اسید چرب در روغن کنجد داشته‌اند بالاترین درصد از پروفایل اسید چرب را برای اسید لینولئیک (۴۷/۶۲ درصد)،اسید اولئیک (۳۵/۳۲ درصد) و اسید پالمیتیک (۱۱/۴۹درصد) گزارش کرده‌اند. شهرت روغن کنجد بدلیل مقدار بالای اسید لینولئیک است و پایداری بالای روغن کنجد به‌دلیل حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان در برابر اکسیداسیون و حفظ اسیدهای چرب ضروری مانند اسید لینولئیک می‌باشد (Gouveia et al., 2017).

جدول ۳ – پروفایل اسیدهای چرب آزاد نمونه‌های روغن کنجد حاوی عصاره چای و پراکسیدان‌های فلزی آهن، مس و روی

Table 3- Free fatty acid profiles of sesame oil samples containing tea extract and metal peroxidants of iron, copper and zinc

rBHT	ro	roZn	roCu	roFe	r	Fatty Acid اسید چرب
0.001± 11.9 ^{a}	13.22±0.000^{b}	13.56± 0.005 ^{c}	14.70±0.005^{d}	14.99±0.000^{e}	15.20 ±0.000^{f}	**C16:0**
2.11± 0.002 ^{a}	1.09 ±0.001^{b}	2.06± 0.000 ^{c}	3.50± 0.001^{d}	3.42 ±0.000 ^{e}	2.47 ±0.002^{f}	**C18:0**
42.04± 0.000 ^{a}	41.18± 0.005^{b}	41.34± 0.000 ^{c}	40.05± 0.001^{d}	40.08 ±0.005^{e}	38.92 ±0.005^{f}	**C18:1**
44.43± 0.001 ^{a}	43.95±0.005^{b}	42.45± 0.005 ^{c}	40.63± 0.001^{d}	41.21 ±0.005^{e}	42.70 ±0.000^{f}	**C18:2**
0.23± 0.001 ^{a}	0.56±0.000^{b}	0.59± 0.000 ^{c}	0.12±0.000^{d}	0.30 ±0.005^{e}	0.70 ±0.000^{f}	**C18:3**
3.970± 0.002 ^{a}	3.324± 0.005^{b}	3.130±0.000^{bc}	2.831±0.000^{d}	2.749 ±0.002^{e}	2.809 ±0.000^{f}	**Se index شاخص Se**

حروف متفاوت، تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ را نشان می‌دهد. آزمون در سه تکرار انجام شده است (r: نمونه روغن کنجد (شاهد)، rofe: روغن کنجد به همراه عصاره چای و آهن، rocu: روغن کنجد به همراه عصاره چای و مس، rozn: روغن کنجد به همراه عصاره چای و روی، ro: روغن کنجد به همراه عصاره چای، rBHT: روغن کنجد به همراه BHT). اسید پالمیتیک (C16:0)، اسید استئاریک (C18:0)، اسید اولئیک (C18:1)، اسید لینولئیک (C18:2)، اسید لینولنیک (C18:3).

Different letters show a significant difference at the 1% level. The test was performed in three replications (r: sesame oil sample (control), rofe: sesame oil with tea and iron extract, rocu: sesame oil with tea and copper extract, rozn: sesame oil with tea and zinc extract, ro: sesame oil with tea extract, rBHT: sesame oil with BHT). Palmitic acid (C16: 0), stearic acid (C18: 0), oleic acid (C18: 1), linoleic acid (C18: 2), linolenic acid (C18: 3).

نتیجه‌گیری

روغن کنجد با اضافه کردن آنتی‌اکسیدان طبیعی چای سفید پایداری اکسایشی بالاتری نسبت به نمونه روغن کنجد بدون آنتی اکسیدان نشان داد. که به‌دلیل حضور ترکیبات فنلی در چای سفید و اثرات سینرژیستی با ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی در روغن کنجد است. روغن کنجد حاصل از پرس سرد به‌دلیل باقی ماندن پوست دانه

که حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی (گاما-توکوفرول) است، پایداری اکسایشی روغن بالاتری نسبت به سایر روش‌های صنعتی تولید روغن کنجد دارد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی در نمونه‌های روغن کنجد حاوی پراکسیدان‌های فلزی نسبت به سایر نمونه‌ها کمترین میزان را داشت. حضور پراکسیدان‌های فلزی به‌ویژه آهن باعث کاهش تاثیرات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی چای سفید و روغن کنجد و کاهش پایداری اکسایشی روغن کنجد شده است. پراکسیدان‌های فلزی به‌ویژه آهن با تشکیل رادیکال‌های آزاد باعث کاهش اسیدهای چرب روغن کنجد بویژه اسید لینولنیک شده است. نتایج شاخص پلی-ان تاییدی بر نتایج رنسمیت بود. روغن کنجد مورد مطالعه در دمای۱۱۰ درجه سانتی‌گراد پایداری کمتر از ۱۲ ساعت را دارا بود. بنابراین برای حرارت‌دهی و سرخ‌کردن مناسب نیست ولی در فرمولاسیون سس‌های سالاد می‌تواند کاربرد داشته باشد.

منابع

1. Abdel-Razek, A. G., El-Shami, S. M., El-Mallah, M. H., Hassanien, M., Mahmoud, M. (2011). Blending of Virgin Olive Oil With Less Stable Edible Oils to Strengthen Their Antioxidative Potencies. *Australian journal basic and applied sciences*, 5(10): 312-318.
2. Abou-Gharbia, H. A., Shehata, A. A., Shahidi, F. (2000). Effect of processing on oidative stability and lipid classes of sesame oil. *Food rsearch international*, 33: 331-340. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00052-1
3. Akbari-Adergani, B., Ezeddin, M., Hashemi Mogaddam, H., Shoeibi, S. (2015). Effect of production process on concentration of lead and arsenic in sunflower oil. *Journal of Mazandaran university of medical sciences*, 25(127): 38-41.
4. Amini, B., Keramat, J., Hojateslami, M., Jahadi, M., Mahmodiyan, K. (2015). Evaluation of antioxidant effects of safflower in rapeseed oil and kilka fish oil. *Food technology and nutrition*, 12(3): 29-38.
5. AOCS. (2009). Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society (5th ed.). Champaign, Il, USA: AOCS Press.
6. Ayadi, M. A., Grati-Kanmoun, N., Attia, H. (2009). Physico-chemical changes and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and chemical toxicology*, 47(10): 2613-2619. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.024
7. Benedet, J. A., Shibamoto, T. (2008). Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in Lipid Peroxidation. *Food chemistry*, 107: 165-168. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.076
8. Bensmira, M., Jiang, B., Nsabimana, C., Jian, T. (2007). Effect of lavender and thyme incorporation in sunflower seed oil on its resistance to frying temperatures. *Food research international*, 40: 341-346. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.004
9. Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotheraphy research*, 4: 323-328. https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q
10. Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*, 78: 2872-2888. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.004
11. Codex Alimentarius. (2005). Codex Standard for Named Vegetable Oils: Codex Stan 210 (Amended 2005), pp. 13.
12. Dini Torkamani, M. R., Karaptyan, ZH. (2007). Investigation of important physical and chemical properties of grain in ten sesame cultivars. *Journal of biology of Iran*, 20(4): 327-333.
13. Farhoosh, R., Hoseini-Yazdi, S-Z. (2014). Evolution of oxidative values during kinetic studies on olive oil oxidation in the Rancimat test. *Journal of the American oil chemists' society*, 91(2): 281-293. https://doi.org/10.1007/s11746-013-2368-z
14. Farhoosh, R., Moosavi, S. M. R. (2007). Rancimat test for the assessment of used frying oils quality. *Journal of food lipids*, 14(3): 263-271. https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2007.00084.x
15. Farmani, J., Tirgarian, B., Razmpour, M. (2019). Evaluation of physicochemical properties of sesame oil from local extraction stores of Mazandaran province. *Food science and technology*, 15(84): 175-187. [In Persian].
16. Farzin, L., Moassesi, M. E. (2014). Determination of metal contents in edible vegetable oils produced in Iran using microwave-assisted acid digestion. *Journal of applied chemical research*, 8(3): 35-43.
17. Fazel, M., Sahari, M. A., Barzegar, M. (2009). Comparison of tea and sesame seed oils as two natural antioxidants in a fish oil model system by radical scavenging activity. *International journal of food science and nutrition*, 60: 567-576. https://doi.org/10.3109/09637480801987625
18. Ghasemi Pirbalouti A, Hossayni I., Shirmardi, H. A. (2013). Essential oil variation, antioxidant and antibacterial activity of mountainfennel [Zaravschanicamembranacea (Boiss.) M. Pimen]. *Journal of Industrial Crops and Products*, 50: 443-448. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.053

19. Golluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozken, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol exteract from *Mentha longifolia* L.ssp. longifolia. *Food Chemistry*, 103: 1449 - 56. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.061
20. Gouveia, L., Zago, L., Moreira, A. (2017). Physical-chemical characterization and nutritional quality of sesame oil (*Sesamum indicum* L.). *Journal of nutritional health and food science*, 5(3): 1-7.
21. Hajiaghaalipour, F., Kanthimathi, M.S., Sanusi, J., Rajarajeswaran, J. (2014). *Food chemistry*, 169: 401-1.
22. Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Z., Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food chemistry*, 71: 229-233. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00161-8
23. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agriculture food chemistry, 53(6): 1841-1856. https://doi.org/10.1021/jf030723c
24. INSO, 13392. (2015). Edible cold pressed oils– Specifications & Test methods. (Iranian National Standardization Organization. 1st. Revision, 2015).
25. Institute of standard and industrial research of Iran. 2004. Edible oils and fats- mixed liquid oils- test method. No. 5950. P: 1-9.
26. Iso 5509. 1978. Animal and vegetable fats and oils– preparation of methyl esters of fatty acids.
27. Kochhar, S. P. (2000). Stabilisation of frying oils with natural antioxidative components. *European journal of lipid science and technology*, 102(8-9): 552-559. https://doi.org/10.1002/1438-9312(200009)102:8/9<552::AID-EJLT552>3.0.CO;2-V
28. Kumar, M., Gupta, V., Kumari, P., Reddy, C. R. K., Jha, B. (2011). Assessment of nutrient composition and antioxidant potential of Caulerpaceae seaweeds. *Journal of food composition and analysis*, 24(2): 270-278. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.07.007
29. Mai, J., Chambers, L. J. (1990). Process for inhibiting liquid oxidation in food. US Patent No. 4891231.
30. Mathew, S., Abraham, T. A. (2006). In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and chemical toxicology*, 44:198-206. https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.06.013
31. Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, M., Mihajlović, B. Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta medica*, 69: 413-419. DOI: 10.1055/s-2003-39704
32. Mirzaei, A., Mohammadi, J., Mirzaei, N., Mirzaei, M. (2011). The Antioxidant capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. *Journal of Fasa University of medical sciences*, 1(3): 160-167.
33. Molodi, F., Ghajar Bigi, p., Haj Hoseini Babaei, A., Mohamadpor Aasl, A. (2016). Evaluation of chemical and oxidative properties of imported extra virgin olive oils. *Journal of food science and nutrition*, 12(4): 27-34.
34. Mukhtar, H., Ahmad, N. (1999). Cancer chemo prevention future holds in multiple agents. *Toxicology and applied pharmacology*, 158(3): 207-210. https://doi.org/10.1006/taap.1999.8721
35. Müller, H., Kirkhus, B., Pedersen, J. I. (2001). Serum cholesterol predictive equations with special emphasis on trans and saturated fatty acids. An analysis from designed controlled studies. *Lipids*, 36(8): 783-791. https://doi.org/10.1007/s11745-001-0785-6
36. Naseri, F. (1996). Oil seeds. Mashhad Publications, Astan Quds Razavi.
37. Nazari, Z., Gharachorlo, M., Elhamirad, A. H. (2017). Investigating the chelating effect of black tea. *Food technology and nutrition*, 14(4): 113-121.
38. Noël, T., Roger, P., Bernard, T., Djikeng, F. T., Azmeera, T., Karuna, M. S. L., Prasad, R. B. N., Womeni, H. M. (2017). Effects of boiling and roasting on proximate composition, lipid oxidation, fatty acid profile and mineral content of two sesame varieties commercialized and consumed in Far-North Region of Cameroon. *Food chemistry*, 15(221): 1308-1316. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.025
39. Ogbonna, P.E., Ukaan, S.I. (2013). Chemical composition and oil quality of seeds of sesame accessions grown in the Nsukka plains of South Eastern Nigeria. African journal of agricultural research. 8(9): 797–803.
40. Ortsater, H., Grankvist, N., Wolfram, S., Kuehn, N., Sjoholm, A. (2012). Diet supplementation with green tea extract Epigallocatechin gallate prevents progression to glucoseintolerance in Mice. *Nutrition and metabolism*, 9: 11-5. https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-11
41. Rohadi R., Lelita, D. I., Putri, A. S. (2019). Antioxidant Capacity of White Tea (Camelia Sinensis) Extract: Compared to Green, Oolong and Black Tea. International Conference on Food Science & Technology, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 292 (2019) 012018, IOP Publishing, doi:10.1088/1755-1315/292/1/012018.
42. Safari, R., Elhami Rad, A. H., Atay Salehi, E. (2016). Evaluation of the antioxidant effect of oily sesame meal extract for stabilization Edible oils. *Innovation in food science and technology*, 8(3):33-44.

43. Shariatifar, N., Kamkar, A., Shams Ardekani, M. R., Misaghi, A., Jamshidi, A. H., Khaniki, Gh. R. (2012). Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant Pulicaria Gnaphalodes. Ofegh -e- danesh journal of Gonabad University of medical sciences. 18(1): 35-41.
44. Sjovall, O., Virtalaine, T., Lapvetelainen, A., Kallio, H. (2000). Development of rancidity in wheat germ analyzed by headspace gas chromatography and sensory analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8): 3522-3527. https://doi.org/10.1021/jf981309t
45. Solimanian, SH., Sadeghi Mahonak, A. R., Alami, M., Ghorbani, M. (2015). Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds and antibacterial and antioxidant activity of Estonian of Valik fruit extract. *Journal of Rafsanjan University of medical sciences*, 13: 53-66.
46. Tynek, M., Pawłowicz, R., Gromadzka, J., Tylingo, R., Wardencki, W., Karlovits, G. (2012). Virgin rapeseed oils obtained from different rape varieties by cold pressed method–their characteristics, properties, and differences. *European journal of lipid science and technology*, 114(3): 357-366. https://doi.org/10.1002/ejlt.201100296
47. Vinson, J., Dabbagh, Y., Serry, M., Jang, J. (1995). Plant flavonoids especially tea flavonols are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43: 28-32. https://doi.org/10.1021/jf00059a005
48. Wanasundara, P. K., Shahidi, F. (2005). Antioxidants: science, technology, and application. In Bailey,s industrial oil and fat products. Shahidi, F. (Eds). John Wiley and Sons, Inc. New Jersey.
49. Widyasanti A., Marpaung, D. S. S., Nurjanah, S. (2016). Activitas antijamur ekstrak teh putih (*Camelia sinensis*) terhadap jamur *Candida albicans* (Antifungal activity of white tea extract to candid, *Journal Teknotan* , 10 (2): 7-15.
50. Yaşar, S. B., Baran, E. K., Alkan, M. (2012). Metal Determinations in olive oil. In agricultural and biological sciences: olive oil– constituents, quality, *Health properties and bioconversions*, 89-108.

Contents

Particle size and root diameter effects on the extraction of glycyrrhizic acid from licorice using ultrasonic: Full factorial experimental design and response surface methodology 179
Zarrin Nasri
Effect of replacing wheat flour with mung bean flour on the texture, physicochemical and sensory properties 195
Fariba Ataei Nukabadi, Narges Nehchiri, Javad Keramat, Manuchehr Momeni Shahraki
Investigation on the chemical composition, bioactive functional groups, antioxidant potential and cell toxicity (HT29) of Shirazi thyme essential oil: A study in laboratory scale 203
Elnaz Saffari Samani, Hossein Jooyandeh, Behrooz Alizadeh Behbahani
Investigation of synergistic effect of sumac extract and phosphatidyl ethanolamine on the chemical properties of mayonnaise 218
Zeynab Abarchai, Alireza Rahman, Maryam Fahimdanesh
Modelling and optimization of microwave-assisted extraction of rosemary using response surface methodology (RSM) 235
Bahman Saedpanah, Nasser Behroozi, Jalal Khorshidi
Effect of addition of bioactive peptide obtained from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on qualitative properties of doogh 249
Nafiseh Karimi, Rezvan Pourahmad, Salman Taheri, Orang Eyvazzadeh
Effect of cinnamic acid on shelf life and quality of button mushroom at postharvest period 264
Hadis Cheraghi, Fardin Ghanbari, Mehdi Saidi
Optimization of subcritical water fluid extraction of phenolic compounds from pistachio hull: evaluation of radical scavenging properties of extracts 277
Morteza Mohammadi, Mohammad Ghorbani, Alireza Sadeghi-Mahonak, Adel Beigbabaie, Samira Yeganehzad
The effect of oil to water ratio and emulsifier amount on the properties of chia seed oil nanoemulsion 295
Sara Forouzandeh, Mohammad Fazel
Production of low-fat doughnut using triticale flour and Basil gum and investigation of the effect of green cardamom essential oil on its shelf life 307
Zahra Sheikholeslami, Mahdi Karimi, Bahareh Sahraiyan
Evaluation of the effect of non-thermal plasma on the physicochemical, technological and functional properties of wheat flour 330
Seyed Amir Tavakoli Lahijani, Fakhri Shahidi, Mahmoud Habibian, Arash Koocheki
Investigation of the synergistic and antagonistic properties of Spirulina platensis and Moringa oleifera extracts on virgin olive oil 343
Sanaz Fallah-Taftizadeh, Gholamreza Abdi, Fatemeh Zendeboodi, Mahdi Mohammadi
The effect of aqueous extract of white tea on heat resistance of sesame oil prepared by cold pressing 367
Sedigheh Yazdanpanah*1 , Sara Mohammadi1, Amir hossein Elhamirad

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 18 No. 2 2022

Published by: Ferdowsi University of Mashhad

Executive Manager: Shahnoushi, N.

Editor-in-Chief: Tabatabaei yazdi, F

Editorial Board:

Mortazavi, Seyed A.	Prof. in Food Microbiology and
Shahidi, F.	Prof. in Food Microbiology
Habibi najafi, M.	Prof. in Food Microbiology
Razavi, Seyed M. A.	Prof. in Food Engineering
Kashaninejad, M.	Prof. in Food Engineering
Khomeiri, M.	Assoc. Prof. in Food Microbiology
Farhoosh, R.	Prof. in Food Chemistry
Fazli Bazzaz, S.	Prof. in Food Microbiology
Koocheki, A.	Prof. in Food Technology
Mohebbi, M.	Prof. in Food Engineering
Ghanbarzadeh, B.	Prof. in Food Engineering
Alemzadeh, I.	Prof. in Food Biotechnology
Rajabzadeh, GH.	Assoc. Prof. in Nanotechnology
Heydarpour, M.	Assoc. Prof. in Food Microbiology
Ghoddusi, H. B.	Assoc. Prof. in Food Microbiology
Khosravidarani, K.	Prof. in Food Biotechnology
Abbaszadegan, M.	Prof. in Food Microbiology
Mohammadifar, M. A.	Assoc. Prof. in Food Engineering
Vosoughi, M.	Prof. in Food Biotechnology
Almasi, H.	Assoc. Prof. in Nanotechnology
Fathi, M.	Assoc. Prof. in Nanotechnology
Abbasi, S.	Prof. in Food Engineering
Borges, N.	Prof. in Food Biotechnology

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.18 No.2

2022

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Iranian food science and technology Association

ISSN:1735-4161

Contents

Particle size and root diameter effects on the extraction of glycyrrhizic acid from licorice using ultrasonic: Full factorial experimental design and response surface methodology 179
Zarrin Nasri

Effect of replacing wheat flour with mung bean flour on the texture, physicochemical and sensory properties 195
Fariba Ataei Nukabadi, Narges Nehchiri, Javad Keramat, Manuchehr Momeni Shahraki

Investigation on the chemical composition, bioactive functional groups, antioxidant potential and cell toxicity (HT29) of Shirazi thyme essential oil: A study in laboratory scale 203
Elnaz Saffari Samani, Hossein Jooyandeh, Behrooz Alizadeh Behbahani

Investigation of synergistic effect of sumac extract and phosphatidyl ethanolamine on the chemical properties of mayonnaise 218
Zeynab Abarchai, Alireza Rahman, Maryam Fahimdanesh

Modelling and optimization of microwave-assisted extraction of rosemary using response surface methodology (RSM) 235
Bahman Saedpanah, Nasser Behroozi, Jalal Khorshidi

Effect of addition of bioactive peptide obtained from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on qualitative properties of doogh 249
Nafiseh Karimi, Rezvan Pourahmad, Salman Taheri, Orang Eyvazzadeh

Effect of cinnamic acid on shelf life and quality of button mushroom at postharvest period 264
Hadis Cheraghi, Fardin Ghanbari, Mehdi Saidi

Optimization of subcritical water fluid extraction of phenolic compounds from pistachio hull: evaluation of radical scavenging properties of extracts 277
Morteza Mohammadi, Mohammad Ghorbani, Alireza Sadeghi-Mahonak, Adel Beigbabaie, Samira Yeganehzad

The effect of oil to water ratio and emulsifier amount on the properties of chia seed oil nanoe mulsion 295
Sara Forouzandeh, Mohammad Fazel

Production of low-fat doughnut using triticale flour and Basil gum and investigation of the effect of green cardamom essential oil on its shelf life 307
Zahra Sheikholeslami, Mahdi Karimi, Bahareh Sahraiyan

Evaluation of the effect of non-thermal plasma on the physicochemical, technological and functional properties of wheat flour 330
Seyed Amir Tavakoli Lahijani, Fakhri Shahidi, Mahmoud Habibian, Arash Koocheki

Continue Content in cover