نشریه علمی
پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران

جلد ۱۸ شماره ۴
سال ۱۴۰۱

شماره پیاپی ۷۶ شاپا: ۱۷۳۵-۴۱۶۱

عنوان مقالات

افزایش عمر ماندگاری فیله مرغ با پوشش زیست تخریب‌پذیر کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) طی نگهداری در یخچال ۳۸۵
ذبیح‌اله بهمنی- پرستو ابولفتحی

بررسی تاثیر و بهینه‌یابی کمیت فسفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* در تولید اسید استیک در فرمانتور ناپیوسته با استفاده از روش سطح پاسخ..... ۳۹۹
مرجان تیموری‌منش- هاجر عباسی

بررسی گروه‌های عاملی ترکیبات زیست‌فعال، توانایی رادیکال گیرندگی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی شنبلیله (*Trigonella foenum*) در شرایط برون‌تنی ۴۱۷
هدیه یوسفی‌پور- محمدامین مهرنیا- بهروز علیزاده بهبهانی- حسین جوینده- محمد حجتی

شناسایی و بررسی اثر پریبیوتیکی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراج شده از پوسته سبز بادام ۴۲۹
رضوان شاددل- صفورا اکبری علویجه

سنجش کمی ترکیب اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب سیلاژ بیولوژیک تولیدشده از ضایعات مرغ ۴۴۳
رضا صفری- سیدولی حسینی- شراره فیروزکندیان- سهیل ریحانی پول- مونا زمانی

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم زیست تخریب‌پذیر جاوشیر حاوی رزین و نانوذرات جاوشیر ۴۵۵
نرگس عکافیان- هاجر شکرچی‌زاده

شناسایی ترکیبات شیمیایی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنل و فلاونوئید کل و سمیت سلولی اسانس رزماری..... ۴۶۹
محسن ابراهیمی همتی کیخا- حسین جوینده- بهروز علیزاده بهبهانی- محمد نوشاد

اثر الیگوفروکتوز و ریزپوشانی بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس رامنوزوس و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی ژله فراسودمند ۴۸۵
فاطمه کارگر- رضوان پوراحمد- پیمان رجایی

استفاده از ضایعات پوست پسته و آرد دانه خربزه در غنی‌سازی سس مایونز کم‌چرب عملگرا و ارزیابی خواص رئولوژیکی آن ۴۵۱
فائزه قورچ بیگی- علیرضا رحمن- فاطمه حسینمردی

تولید نانوامولسیون بر پایه روغن بادام شیرین و کنجد با استفاده از امواج فراصوت و ارزیابی ویژگی‌های آن ۵۱۶
معصومه حیدری قره‌چشمه- اکرم آریان‌فر- الهام مهدیان- سارا ناجی طبسی

ادامه فهرست داخل جلد

نشریه علمی پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸ شماره ۴ سال ۱۴۰۱ 2022 Vol.18 No.4
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 ۴ مهر- آبان 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

افزایش عمر ماندگاری فیله مرغ با پوشش زیست تخریب‌پذیر کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) طی نگهداری در یخچال ۳۸۵

ذبیح‌اله بهمنی- پرستو ابولفتحی

بررسی تاثیر و بهینه‌یابی کمیت فسفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* در تولید اسید استیک در فرمانتور ناپیوسته با استفاده از روش سطح پاسخ ۳۹۹

مرجان تیموری‌منش- هاجر عباسی

بررسی گروه‌های عاملی ترکیبات زیست‌فعال، توانایی رادیکال گیرندگی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی شنبلیله (*Trigonella foenum*) در شرایط برون‌تنی ۴۱۷

هدیه یوسفی‌پور- محمدامین مهرنیا- بهروز علیزاده بهبهانی- حسین جوینده- محمد حجتی

شناسایی و بررسی اثر پریبیوتیکی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراج شده از پوسته سبز بادام ۴۲۹

رضوان شاددل- صفورا اکبری علویجه

سنجش کمی ترکیب اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب سیلاژ بیولوژیک تولیدشده از ضایعات مرغ ۴۴۳

رضا صفری- سیدولی حسینی- شراره فیروزکندیان- سهیل ریحانی پول- مونا زمانی

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم زیست تخریب‌پذیر جاوشیر حاوی رزین و نانوذرات جاوشیر ۴۵۵

نرگس عکافیان- هاجر شکرچی‌زاده

شناسایی ترکیبات شیمیایی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنل و فلاونوئید کل و سمیت سلولی اسانس رزماری ۴۶۹

محسن ابراهیمی همتی کیخا- حسین جوینده- بهروز علیزاده بهبهانی- محمد نوشاد

اثر الیگوفروکتوز و ریزپوشانی بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس رامنوزوس و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی ژله فراسودمند ۴۸۵

فاطمه کارگر- رضوان پوراحمد- پیمان رجایی

استفاده از ضایعات پوست پسته و آرد دانه خربزه در غنی‌سازی سس مایونز کم‌چرب عملگرا و ارزیابی خواص رئولوژیکی آن ۴۵۱

فائزه قورچ بیگی- علیرضا رحمن- فاطمه حسینمردی

تولید نانوامولسیون بر پایه روغن بادام شیرین و کنجد با استفاده از امواج فراصوت و ارزیابی ویژگی‌های آن ۵۱۶

معصومه حیدری قره‌چشمه- اکرم آریان‌فر- الهام مهدیان- سارا ناجی طبسی

تهیه و ارزیابی ویژگی‌های شناساگر حساس به pH بر پایه فیلم کامپوزیتی صمغ عربی-کربوکسی متیل سلولز حاوی آنتوسیانین ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*. L) ۵۲۹

امیر رضائی- مسعود رضائی- مهدی آل بوفتیله

توسعه یک روش آنالیز جهت تعیین محتوای آکریل‌آمید در واریته‌های هسته خرمای برشته ۵۴۵

پانیذ خالوکرمانی- مرضیه معین‌فرد- رضا فرهوش- آرمیندا آلوش

تولید نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با پوشش کیتوزان و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی محصول علیه *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* ۵۶۳

سهیل ریحانی پول- سکینه یگانه- رضا صفری

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 383- 395

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۳۹۵-۳۸۳

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

Full Research Paper

Shelf life extension of chicken fillets by biodegradable chitosan coating containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil during refrigeration

Zabihalh Bahmani[1*], Parastoo Abolfathi[2]

Received: 2021.04.23
Revised: 2021.06.08
Accepted: 2021.06.20
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Bahmani, Z., Abolfathi, P. (2022). Shelf life extension of chicken fillets by biodegradable chitosan coating containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil during refrigeration. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 383-395.

Abstract

Introduction: With increasing demand for chicken meat, the chemical composition of meat carcasses has become more important. Despite advances in medical care and food technology in recent years, foodborne infections and food poisoning, as well as food spoilage in developed and developing countries are still a major problem for human health and the economy. During the storage period, the quality characteristics of meat is shortened due to bacterial and oxidative spoilage. Oxidative spoilage causes unpleasant odors, unpleasant changes in taste, and changes in the structure of nutrients and reduces the nutritional value of the product. While spoilage and microbial contamination lead to product wastage and poses serious health risk to consumers. Increasing interest in using less synthetic preservatives has led to use of natural derivatives with antimicrobial properties. Biodegradable coatings are a good alternative to plastic packaging, given the problems they have with recycling and environmental pollution. Chitosan coating containing *Zataria multiflora* essential oil is known to possess good antioxidant and antibacterial properties due to the presence of thymol and carvacrol compounds and their ability to establish hydrogen bonds with other monoterpenes such as γ-tropenes.

Materials and methods: *Zataria multiflora* was purchased in the spring from Sari Medicinal Plants Store. It's essential oil was prepared by distillation method using Clevenger and then dehydrated with sodium sulfate and passed through 0.45 µm syringe filters and stored in dark containers at 4°C (Rezaie et al., 2015).In this study, the use of biodegradable and edible coating of chitosan with thyme essential oil to increase the shelf life of chicken fillets during refrigeration was investigated. Treatments included control, 2% chitosan, 1.5% essential oil and treatment containing 2% chitosan with 1.5% essential oil, which were stored at 4 ° C for 24 days. The antioxidant and antimicrobial properties of chitosan and thyme essential oil were evaluated by measuring the total amount of phenolic compounds, free radical scavenging (DPPH), and FRAP. Quality assessment with chemical tests; pH, TBA, TVB-N, and microbial count (mesophilic bacteria and Pseudomonas) were measured at 4-day intervals.

Results and discussion: The results of quality assessment during the refrigeration period for all treatments showed an increasing trend in pH. TBA (mg MDA/kg fat), TVB-N (mg N/100g), TMC and Pseudomonas (CFU/g) in coated treatments with 2% chitosan and 1.5% essential oil on day 24 of storage were 6.6, 1.78, 26.8, 6.7 and 6.42, respectively, and showed the highest shelf-life. Since, thyme essential oil and chitosan have increased the shelf-life of chicken fillets due to their antioxidant and antimicrobial activity.

The use of biopolymers such as chitosan, gelatin, etc., which have a good ability to maintain and release antioxidant and antimicrobial compounds, is increasing in food packaging. In this study, the preservation effects of chitosan coating

1. Assistant Professor, Department of Biotechnology and Seafood Processing, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Institute of Fisheries Science Research of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization. Bandar Abbas, Iran.
2. MSc in Biotechnology of food science and industry from Rodaki University, Tonekabon, Iran.
(*Corresponding Author Email: zabihbahmani@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69985.1035

containing *Zataria multiflora* essential oil on increasing the shelf life of chicken fillets were investigated and it was found that chitosan coating and *Zataria multiflora* essential oil alone and in combination had good preservation effects. According to the results, 2% chitosan coating containing *Zataria multiflora* essential oil can increase the shelf life of chicken fillets, which is due to the very good performance of chitosan coating containing *Zataria multiflora* essential oil due to its synergistic effect on antimicrobial and antioxidant properties. Between chitosan coating and thyme essential oil in preventing microbial growth and chemical spoilage and shelf life for control treatments, chitosan 2%, thyme essential oil 1.5%, and chitosan 2% containing thyme essential oil 1.5% respectively 8, 16, 16 and 24 days. Therefore, they can be used to store chicken fillets and meat products.

Keywords: Chicken fillet, *Zataria multiflora* Boiss, chitosan, Biodegradable coating.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 383- 395

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۳۹۵-۳۸۳

مقاله علمی-پژوهشی

افزایش عمر ماندگاری فیله مرغ با پوشش زیست تخریب‌پذیر کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) طی نگهداری در یخچال

ذبیح‌اله بهمنی[۱*]- پرستو ابولفتحی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۳۰

چکیده

پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر جایگزین مناسبی برای بسته‌بندی با مواد پلاستیکی، با توجه به مشکلاتی که در بازیافت و آلودگی طبیعت دارند، می‌باشند. در این پژوهش، عمر ماندگاری فیله مرغ با استفاده از پوشش زیست تخریب‌پذیر کیتوزان به همراه اسانس آویشن شیرازی در دمای یخچال (۴± ۲°C) مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل شاهد، تیمار ۲٪ کیتوزان، تیمار ۱/۵٪ اسانس و تیمار حاوی ۲٪ کیتوزان به‌همراه ۱/۵٪ اسانس بود که به مدت ۲۴ روز در دمای ۴°C نگهداری شدند. خواص ضدمیکروبی و ضداکسایشی کیتوزان و اسانس آویشن شیرازی با به‌ترتیب سنجش میزان کل ترکیبات فنولیک، مهار رادیکال آزاد (DPPH) و آزمون احیاء آهن (FRAP) تعیین شد وکیفیت فیله مرغ با آزمون های شیمیایی؛pH، TBA، TVB-N و میکروبی (باکتری‌های مزوفیلو سودوموناس) در فواصل زمانی ۴ روزمورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارزیابی شاخص‌های pH، TBA (mg MDA/kg fat)، TVB-N (mg N/100g)، TMC و سودوموناس (CFU/g) طی دوره نگهداری در یخچال روند افزایشی داشته و مقادیر آن‌ها در روز ۲۴ نگهداری در تیمار شاهد به‌ترتیب ۷/۵، ۲/۹، ۴۳/۵، ۸/۶۷، ۸/۵ و در تیمارهای پوشش دهی شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس ۱/۵٪ به‌ترتیب ۶/۶، ۸/۷۸، ۲۶/۱، ۶/۷ و ۶/۴۲ بوده است که به‌ترتیب کمترین و بیشترین عمرماندگاری را نشان دادند. با توجه به این که پوشش حاوی ۲٪ کیتوزان به همراه ۱/۵٪ اسانس آویشن شیرازی باعث افزایش عمر ماندگاری فیله‌های مرغ شده است بنابراین، جهت نگهداری فرآورده های گوشتی مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فیله مرغ، آویشن شیرازی، کیتوزان، پوشش زیست تخریب‌پذیر.

مقدمه

گوشت مرغ ارزان‌ترین نوع گوشت در اکثر کشورها است به همین دلیل در سبد غذایی بیشتر مصرف‌کنندگان وجود دارد. با افزایش تقاضا برای مصرف گوشت مرغ، توجه به کیفیت آن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شد. مهمترین شاخص‌های ارزیابی کیفیت فرآورده‌های گوشتی، عبارتند از شاخص‌های حسی (بافت، رنگ، بو و طعم)، میکروبی و شیمیایی آن است (Seydim et al., 2006). فرآورده‌های گوشت به دلیل دارا بودن عوامل مساعد داخلی برای رشد باکتری‌های ویژه فساد[۳] (SSOs)، محیط مناسبی برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها و واکنش‌های شیمیایی است و در صورت عدم کنترل عوامل خارجی، به سرعت فاسد می‌شود (Nouri et al., 2012). پس از کشتار مجموعه تغییرات شیمیایی، فیزیکی و میکروبی در لاشه گوشت آغاز می‌شود که این تغییرات، موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در خصوصیات کیفی و ارزش غذایی محصول می‌شود. گوشت و فرآورده‌های گوشتی ممکن است به آسانی به میکروب‌های مختلف آلوده شوند. در صورتی که شرایط حمل و نقل و نگهداری آن‌ها مناسب نباشد، باکتری‌های مولد فساد و بیماری زا در گوشت شروع به فعالیت می‌کنند و کیفیت گوشت را کاهش می دهند و ضمن کاهش ارزش تغذیه ای، بهداشت و ایمنی آن را نیز دچار مشکل می‌کنند (Vernozy-Rozand et al., 2002). مجموعه این تغییرات باعث بروز مشکلاتی در نگهداری گوشت و عمر ماندگاری آن

۱- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و فرآوری آبزیان، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. بندرعباس، ایران.
۲- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی علوم و صنایع غذایی دانشگاه رودکی، تنکابن، ایران.

* - نویسنده مسئول: Email: zabihbahmani@gmail.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69985.1035
۳.Specific Spoilage Organisms

می‌شود. برای ارزیابی کیفیت گوشت، روش‌های مختلفی وجود دارد که پیشرفت این روش‌ها عموما معیاری از کیفیت گوشت است. از جمله تغییراتی که طی نگهداری در گوشت ماکیان اتفاق می‌افتد می‌توان به رشد باکتری‌های مزوفیل، سایکروفیل و تغییرات شیمیایی از قبیل مقدار بازهای ازته فرار (TVB-N)، عدد پراکسید (PV)، شاخص اسید تیوباربیتوریک (TBA) و pH اشاره نمود (Fazlara et al., 2017). محققین صنعت غذا تاکنون پژوهش‌های گوناگونی را به‌منظور افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی گوشتی انجام داده‌اند که نشان از اهمیت بالای نگهداری این مواد غذایی حساس به فساد دارد. امروزه تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از مواد غذایی با ترکیبات نگهدارنده سنتزی و مصنوعی کمتر شده است و تقاضای برای محصولات باکیفیت، ارگانیک و استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی را در مواد غذایی افزایش یافته است. از این‌رو استفاده از پوشش‌های خوراکی طبیعی به عنوان راه حلی برای افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی مورد توجه قرار گرفت و پژوهش‌های متعددی در توسعه و یا کاربرد پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مانند نشاسته، مشتقات سلولز، کیتین، کیتوزان، موسیلاژ، صمغ‌ها، ژلاتین و چربی در مواد غذایی مطرح شد. این ترکیبات جهت پوشش‌دهی غذاهای تازه و فرآوری شده و به‌منظور افزایش عمر ماندگاری آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sales, 1998; Fisher et al., 2000; Verma et al., 2017) که از آن جمله می‌توان استفاده از نشاسته به‌همراه اسانس سیر و پوست لیمو ترش برای افزایش ماندگاری فیله ماهی شیر (Rahmani et al., 2018)، موسیلاژ دانه بارهنگ به‌همراه اسانس شوید برای افزایش عمر ماندگاری گوشت گاو در یخچال (Alizadeh Behbahani et al., 2017)، کاربردپوشش خوراکی کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور بر روی کیفیت و ماندگاری گوشت مرغ در دمای یخچال (Hassanzadeh et al., 2011)، تأثیر پوشش و فیلم مخلوط خوراکی کیتوزان- ژلاتین بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و حسی ماهی شوریده بلانگر نگهداری شده در یخچال (Saki et al., 2017) و پلیمرهایی از این قبیل جهت تهیه پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر اشاره نمود. کیتوزان یک پلی‌ساکارید کاتیونی با وزن مولکولی بالا است که از استیله شدن کیتین تولید می‌شود و پلیمری بسیار مناسب برای حفاظت از ترکیبات فنولی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان مختلف است. کیتوزان توانایی بسیار بالایی در تشکیل فیلم و پوشش‌های خوراکی دارد. همچنین خاصیت ضدمیکروبی و بیوشیمیایی آن باعث شده است تا به‌عنوان پوشش‌های ضدمیکروبی مورد توجه قرار گیرند. تلفیق اسانس‌ها با کیتوزان باعث افزایش خصوصیات آنتی‌میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می شود و نفوذپذیری به بخار آب را کاهش می‌دهد (Giatrakou et al., 2010; Ojagh et al., 2010).

گیاه آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora Boiss* متعلق به خانواده Lamiaceae یکی از گیاهان دارویی است که به‌طور گسترده ای در نواحی گرمسیری ایران، پاکستان و افغانستان می‌روید (Behnam and Ali Akbarloo, 2013). این گیاه در طب سنتی به عنوان ضدعفونی‌کننده، ضدالتهاب و طعم‌دهنده در مواد غذایی به‌کار می‌رود. اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات ضدمیکروبی و ضداکسایشی می‌باشد که به‌طور عمده به ترکیبات فنولی آن نسبت داده می‌شود. هرچه میزان ترکیبات فنولی در اسانس بیشتر باشد فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی‌میکروبی اسانس نیز بیشتر خواهد بود. عمده‌ترین ترکیبات فنولی موجود در اسانس آویشن شامل کارواکرول، اوژنول و تیمول است (Vilela et al., 2009). اسانس‌های گیاهی یکی از منابع بالقوه ترکیبات ضدباکتریایی و ضداکسایشی می‌باشند و برای این منظور بسیار موثر و مفید هستند (Girolami et al., 2003). مکانیسم اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی مرتبط با خواص آبگریزی آن‌ها است. این خاصیت منجر به نفوذ اسانس‌ها به داخل فسفولیپیدهای غشای باکتری‌ها و میتوکندری آن‌ها می‌شود و با ایجاد اختلال در ساختار آن ها نفوذپذیری را افزایش می‌دهند که منجر به خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی شده و در نهایت مرگ باکتری را در بر خواهد داشت (Nouri et al., 2012). در این پژوهش از تکنیک پوشش‌دهی (غوطه‌وری) توسط کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی در فیله‌های مرغ به‌منظور بالا بردن مدت زمان نگهداری در دمای یخچال استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده شامل؛ اسید بوریک، اسید استیک، گلیسرول، اکسید منیزیم، نشاسته، کربنات سدیم، DPPH از شرکت مرک (آلمان)، کیتوزان، معرف فولین سیوکالچوو تویین ۸۰ (سیگما آلدریچ، آلمان)، معرف متیل رد و فنل رد، و محیط کشت پلیت کانت اگار و CFC/CN (کیولب، کانادا)، بوتانل (مجللی، ایران)، اسید تیوباربیتوریک (تیتراکم، امریکا) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی مازندران- ساری، کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار و در آزمایشگاه شیمی و میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه رودکی انجام شده است.

استخراج اسانس

برای تهیه اسانس، گیاه آویشن شیرازی در فصل بهار از فروشگاه گیاهان دارویی ساری خریداری و توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی مازندران- ساری نام علمی آن تایید شد. اسانس آن به روش تقطیر با استفاده از روش کلونجر تهیه و سپس با سولفات سدیم

آبگیری و از فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرونی عبور داده و درظروف تیره در دمای ۴ °C نگهداری شد (Rezaie et al., 2015).

آزمون اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد (DPPH)

برای اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال آزاد اسانس ۰/۳ میلی‌لیتر از اسانس آویشن شیرازی به ۳/۷ میلی لیتر محلول متانولی (۶×۱۰^{۵}) DPPH اضافه گردید و مخلوط حاصل به شدت همزده شد. بعد از ۳۰ دقیقه تاریک خانه‌گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها خوانده شد. درصد مهار از طریق رابطه زیر محاسبه شد (Al-bahri et al., 2017).

$$DPPH\% = \frac{Sampleabsorb(nm) - DPPHabsorb(nm)}{DPPHabsorb(nm)} \quad (۱)$$

آزمون احیاءکنندگی (FRAP)

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن، معرف FRAP در بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار، ۱۰ میلی‌مولار محلول TPTZ در محلول ۴۰ میلی‌مولار اسید کلریدریک و کلرید آهن ۳، ۲۰ میلی‌مولار در پروپیونات ۱۰:۱:۱ حجمی/ حجمی تهیه شد. واکنشگر FRAP به‌صورت روزانه و تازه تهیه شد و قبل از استفاده در بن ماری تا دمای ۳۷ °C گرم شد. ۵۰ میکرولیتر از عصاره های مختلف به ۳ میلی‌لیتر از واکنشگر FRAP اضافه شد. بعد از ۴ دقیقه جذب رنگی محصول (کمپلکس فروس تری پیریدیل تری‌آزین) در طول موج ۵۹۳ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از محلول آهن (II) سولفات (۳۰۰۰- صفر میکرومولار) خوانده شد و نتایج بر حسب میکرومول آهن (II) در میلی‌گرم وزن خشک عصاره (میکرومول بر میلی‌گرم) محاسبه شد (Benzie and Strain, 1996).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی اسانس آویشن شیرازی و فیلم کیتوزان با روش (Dorman et al., 2003) انجام شد. به این منظور غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از اسانس با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالچو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه همزده شد. محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ShimadzuUV-1280 با طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تهیه پوشش کیتوازن

تهیه محلول کیتوزان مطابق با روش Rao و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. بدین منظور پودر کیتوزان با وزن مولکولی و درجه داستیلاسیون (DD) بالارا در اسید استیک ۱٪ حل کرده تا محلول ۲٪ به‌دست آید. محلول به مدت یک شب در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی با دور ۱۰۰۰g همزده و با کاغذ صافی شماره ۳ صاف شد. سپس گلیسرول به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم کیتوزان به عنوان پلاستی‌سایزر و توئین ۸۰ به مقدار ۰/۲۵٪ به‌عنوان امولسیفایر اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق روی استیرر مخلوط گردید. pH محلول با استفاده از سود در حدود ۵/۸ تنظیم شد (Rao et al., 2010). برای نمونه‌های پوشش حاوی اسانس، اسانس به میزان ۱/۵٪ حجمی/ حجمی به محلول پوشش تهیه شده افزوده شد.

آماده سازی فیله‌های مرغ

لاشه‌های مرغ تازه به تاریخ کشتار روز از کشتارگاه سیرنگ (تنکابن) در فصل بهار تهیه و به‌صورت دستی فیله شدند. وزن فیله‌ها به‌طور متوسط ۱۰۰gr تا ۱۲۰ بود که پس از شستشو با آب، فیله‌ها جهت آب‌کشی بر روی آبکش پلاستیکی استریل قرار داده شدند.

پوشش‌دهی فیله‌های مرغ

نمونه‌های فیله مرغ به مدت ۳۰ ثانیه در محلول پوشش کیتوزان ۲٪ قرار داده شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود میکروبی در دمای محیط استریل قرار گرفتند تا خشک شوند. فیله‌های مرغ سپس در داخل ظروف پلاستیکی و در یخچال در دمای ۴ °C قرار داده شدند. آزمون‌های شیمیایی و میکروبی در فواصل زمانی صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ روز انجام شد (Nosratollahi et al., 2019).

آنالیز میکروبی

شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی (TMC) به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷°C با محیط کشت پلیت کانت اگار و برای شمارش باکتری‌های سودوموناس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵°Cبا محیط کشت CFC/CN انجام شد (ISIRI 5272, 2007).

آنالیز شیمیایی

اندازه گیری pH نمونه‌های فیله مرغ با استفاده از pHمتر انجام شد. ابتدا pHمتر با استفاده از بافرهای ۴، ۷ و ۹ کالیبره شد. ۱۰ گرم نمونه گوشت با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر هموژن شد و بعد از صاف کردن توسط کاغذ صافی pH مایع به‌دست آمده با استفاده از pHمتر اندازه‌گیری شد (Ionescu et al., 2008)، برای تعیین میزان TBA، ۱۰gr از نمونه در داخل لوله سانتریفوژ ۵۰ ml وزن شد و با اضافه کردن ۳۵ ml اسید پرکلریک ۴٪ و یک میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد BHT در اتانول هموژنیزه گردید. مخلوط توسط فیلتر کاغذی واتمن

شماره ۴ فیلتر شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده با ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۲ مولار TBA در داخل لوله آزمایش درب‌دار مخلوط گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها میزان جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۳۲ نانومتر در برابر محلول شاهد (۵ میلی‌لیتر اسیدپرکلریک ۴٪ و ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ میلی‌مول TBA) خوانده شد و میزان TBA بر اساس mg MDA/kg Fat محاسبه گردید (Pikul et al., 1989). برای اندازه‌گیری بازهای ازته فرار از روش Jeon و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. بدین منظور به بالن تقطیر کلدال ۱۰ gr از نمونه گوشت، ۲ gr اکسید منیزیم و ۳۰۰ml و چند قطعه سنگ جوش اضافه شد. در یک ارلن مایر به ظرفیت ۵۰۰ ml تا ۷۰۰ که به‌عنوان ظرف گیرنده زیر قسمت سرد کننده دستگاه تقطیر قرار گرفت ۲۵ ml از محلول ۲٪ اسید بوریک و چند قطره معرف متیل قرمز اضافه شد. بعد از انجام عملیات تقطیر محلول تقطیر شده به‌وسیله اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر و مقدار مصرف اسیدسولفوریک در عدد ۱۴ ضرب، و مقدار بازهای ازته فرار بر حسب mg N/100gr Flesh محاسبه شد (Jeon et al., 2002).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS version 22، آزمون آنالیز واریانس دو طرفه Two-way ANOVA و آزمون دانکن، برای مقایسه میانگین داده‌ها، و برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی، DPPH و FRAP در کیتوزان (۲٪) و اسانس آویشن شیرازی (۱/۵٪)

نتایج مقدار ترکیبات فنولی، درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH) و احیاء آهن (FRAP) آویشن شیرازی و کیتوزان در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی و پوشش کیتوزان

Table 1- Amount of phenolic compounds and antioxidant properties of thyme essential oil and chitosan coating

ماده Component	Phenolic(mg GA/g)	DPPH (%)	FRAP (µmol/g)
آویشن شیرازی Thyme essential oil	19.1± 2.3*	39.2±0.4*	25.7± 4.9*
کیتوزان Chitosan	8.34±2.1	14.3±2.1	10.1±1.25

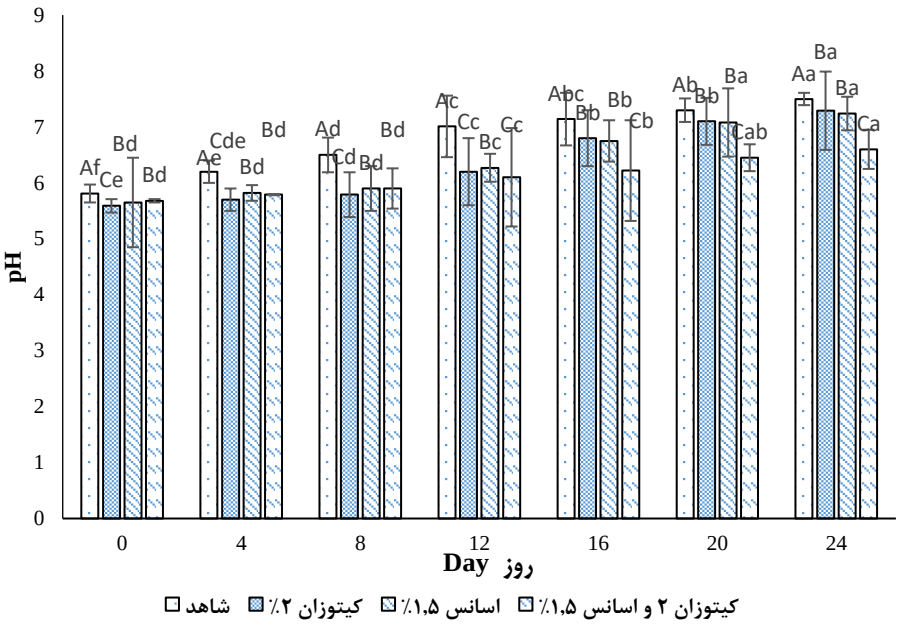
وجود علامت * بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) در هر شاخص بین دو اسانس می‌باشد

با توجه به نتایج جدول ۱ مقدار ترکیبات فنولی (mg GA/g)۱۹/۱ و ۸/۳۴، درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ۳۹/۲ و ۱۴/۲ و مقدار احیاء آهن (µmol/g) ۲۵/۷ و ۱۰/۱ به‌ترتیب در آویشن شیرازی و کیتوزان، مشخص شد که اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان هر دو دارای دارای ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی هستند که به‌دلیل وجود ترکیباتی مانند کارواکرول و تیمول (حدود ۷۰٪ کل ترکیبات اسانس) و همچنین ترکیبات آلفاپینن، پی‌سیمن، گاماترپنین، آلفاترپنین، لینالول در اسانس آویشن شیرازی و وجود بار مثبت در مولکول‌های کیتوزان می‌باشد (Bagamboula et al., 2004; Moradi et al., 2010; Kashiri et al., 2016; Arya et al., 2019). در پژوهش‌های متعددی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت که مطابق با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر عبارتند از؛ اثر اسانس آویشن شیرازی و مرزه بر گوشت مرغ طی نگهداری در یخچال (Behnam and Aliakbarlou, 2013)، اسانس آویشن شیرازی، پونه کوهی و مخلوط آن‌ها برکیفیت گوشت بلدرچین در مقایسه با آنتی‌بیوتیک ویرجینامایسین، اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره ادویه‌ها بر افزایش ماندگاری گوشت مرغ خام (Babuskin et al., 2014) و تهیه و ارزیابی فیلم زیست تخریب‌پذیر کیتوزان و اسانس دارچین بر کیفیت قزل‌آلای رنگین کمان بود (Ojagh et al., 2010).

اندازه‌گیری pH

شکل ۱ نتایج تاثیر پوشش خوراکی کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی بر pH فیله مرغ طی نگهداری در یخچال را نشان می‌دهد. مقدار pH در همه تیمارها روند افزایشی داشته است. میزان pH اولیه در تیمار شاهد ۵/۸۱ بود که در روز ۲۴ نگهداری به ۷/۵ رسیده است. تغییرات pH در فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی از ۵/۶۸ در روز اول نگهداری به ۶/۶ در روز ۲۴ نگهداری در یخچال رسید و کمترین تغییرات میزان pH را طی دوره نگهداری داشته است (p<۰/۰۵). چنین نتایجی در پژوهش Ruiz-

Capillas و Moral (۲۰۰۱) دیده شد. آنها دلیل افزایش pH طی دوره نگهداری را ناشی از فعالیت باکتری‌ها و آنزیم‌های داخلی و تولید ترکیبات ازته فرار مانند آمونیاک (NH_3)، تری‌متیل آمین (TMA)، دی متیل آمین (DMA) و آمین‌های بیوژن (BA) دانستند (Ruiz-Capillas and Moral, 2001). در بررسی تأثیر اسانس لیموترش و گشنیز به‌کار رفته در پوشش کربوکسی متیل سلولز (CMC) بر pH گوشت توسط Hosseini و همکاران (۲۰۱۴) اعلام شد که میزان pH در نمونه‌هایی دارای پوشش CMC و فاقد اسانس، بالاتر می‌باشد. دلیل این امر را عدم وجود ترکیبات فنولی در گوشت دارای پوشش CMC ذکر شد که باعث فعالیت بیشتر میکروارگانیسم‌ها در گوشت و به دنبال آن تجزیه پروتئین و تولید ترکیبات ازته فرار و ایجاد خاصیت بازی در گوشت شده است (Hosseini et al., 2014). اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان با مهار باکتری‌های پروتئولیتیک فساد بافت پروتئینی را به تأخیر انداخته در نتیجه pH پایین‌تری نسبت به تیمار شاهد نشان می دهد (Gill, 1983; Behnam and Aliakbarlou, 2013).



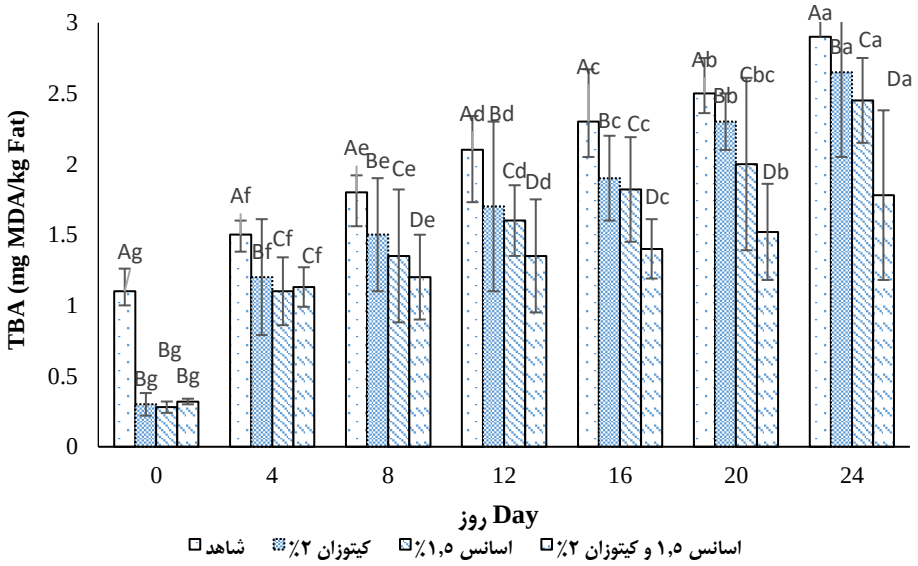
شکل ۱- تغییرات pH نمونه های فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال(حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد)

Fig. 1. PH changes of chicken fillet samples during the storage period in the refrigerator

اندازه‌گیری شاخص TBA

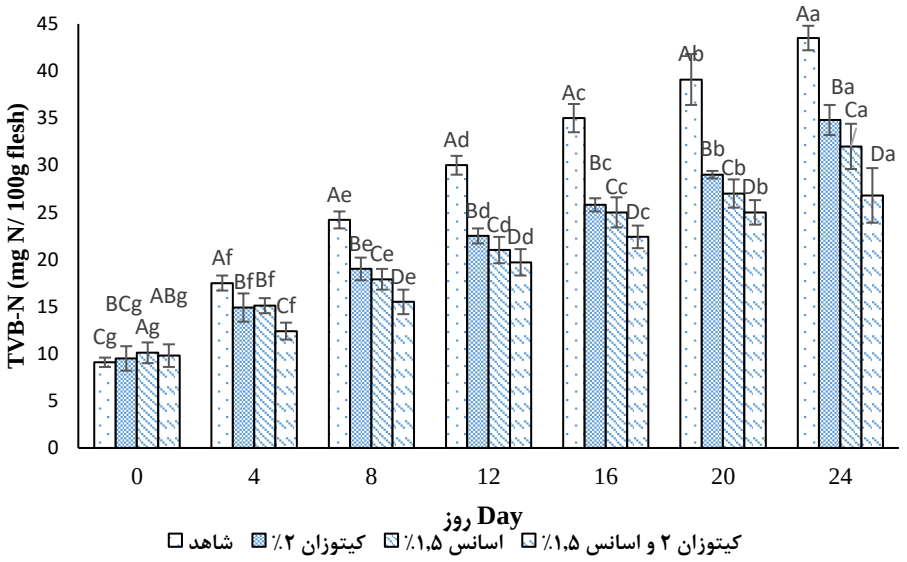
اکسیداسیون چربی‌ها باعث ایجاد ترکیباتی مانند آلدئید، کتون، اسید و الکل می‌شود که متعاقب آن باعث ایجاد تغییراتی در عطر، طعم و ارزش تغذیه‌ای فرآورده‌های گوشتی می‌شود (Babuskin et al., 2014). شاخص TBA، یکی از شاخص های ارزیابی میزان اکسیداسیون چربی است که میزان محصولات ثانویه اکسیداسیون مانند آلدهیدها و کتون‌ها را نشان می دهد (Kostaki et al., 2009) که از شکست شدن و یا اکسید شدن ترکیبات هیدروپراکسیدها ایجاد می‌شود (Gimenez et al., 2002). نتایج تغییرات شاخص اسیدتیوباربیتوریک تیمارهای مختلف در شکل ۲ نشان داده شد. که طی مدت نگهداری در یخچال شاخص اسید تیوباربیتوریک در تمام نمونه‌ها افزایش یافته است. میزان شاخص TBAدر روز ۲۴ نگهداری در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲، اسانس ۱/۵٪، و پوشش کیتوزان ۲٪ حاوی ۱/۵٪ آویشن شیرازی به‌ترتیب ۲/۹، ۲/۶۵، ۲/۴۵ و ۱/۷۸ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید بر کیلوگرم چربی بود. بیشترین و کمترین میزان TBA به‌ترتیب در نمونه شاهد و نمونه‌های فیله مرغ تیمار شده با پوشش کیتوزان حاوی اسانس آویشن مشاهده شد. اختلاف بین تیمار شاهد با دیگر تیمارها طی دوره نگهداری در یخچال معنی‌دار بود ($p<0/05$). انجام پژوهش های متعدد در زمینه به‌کارگیری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نشان داد که افزودن اسانس و عصاره های گیاهی به روغن‌ها و اسیدهای چرب غیراشباع، اکسیداسیون را کند و یا متوقف می‌کند (Yanishlieva et al., 2006). سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس زیره سیاه با شاخص اسید تیوباربیتوریک نشان داد که اسانس زیره سیاه به دلیل وجود ترکیبات آلفاسیمن، آلفالانگیپنین، لانگیفولن، کارواکرول، تیموکینون و تیموهیدروکینون فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر از آنتی‌اکسیدانی مصنوعی

و توانایی کاهش TBA، در تیمارهای مورد مطالعه را دارد (Singh et al., 2014).



شکل ۲- تغییرات اسید تیوباربیتوریک (TBA) نمونه‌های فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال (حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد).

Fig. 2. Changes of thiobarbituric acid (TBA) of chicken fillet samples during the storage period in the refrigerator



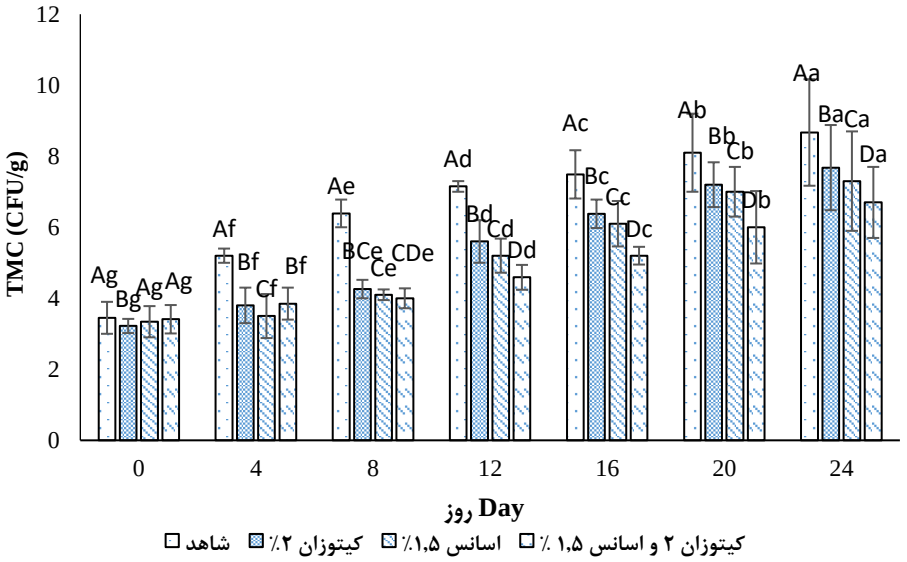
شکل ۳- تغییرات بازهای ازته فرار (TVB-N) نمونه‌های فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال (حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد).

Fig. 3. Changes of total volatile nitrogen bases nitrogen (TVB-N) of chicken fillet samples during the storage period in the refrigerator

اندازه‌گیری شاخص TVB-N

شاخص (TVB-N)، یکی از مهمترین شاخص‌های شیمیایی تعیین کننده فساد فرآورده‌های گوشتی نظیر گوشت مرغ می‌باشد. بازهای ازته فرار یک اصطلاح کلی برای مجموع ترکیبات تری‌متیل آمین (TMA)، دی‌متیل آمین (DMA)،آمونیاک، نوکلئوتیدها و دیگر ترکیبات فرار که در آنها نیتروژن وجود دارد که در نتیجه فعالیت باکتری‌های عامل فساد

و آنزیم‌های داخلی که با دآمیناسیون اسیدهای آمینه و کاتابولیسم نوکلوتیدها، تولید می‌شوند (Cakli et al., 2005; Razavi Shirazi, 2007; Li et al., 2012) و حد مجاز ترکیبات ازته فرار (TVB-N) در فیله مرغ ۲۸–۲۹ mg N/100g Flesh تعیین شده است (Balamatsia et al., 2006). به‌طورکلی بین میزان تولید بازهای ازته فرار و رشد باکتریایی رابطه مستقیمی وجود دارد. از آنجایی که در نمونه شاهد که تعداد باکتری‌های بیشتری رشد نموده، لذا میزان TVB-N بیشتری تولید شده است (Gram and Huss, 1996). شکل ۳، مقادیر ترکیبات ازته فرار (TVB-N) در تیمارهای مورد مطالعه طی دوره نگهداری را نشان می‌دهد. در تمام تیمارها میزان ترکیبات ازته فرار طی دوره نگهداری در یخچال افزایش یافته است. میزان این ترکیبات در روز صفر نگهداری در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس ۱/۵٪، و پوشش کیتوزان ۲٪ حاوی آویشن شیرازی با غلظت ۱/۵٪ به‌ترتیب ۹/۰۹، ۹/۵، ۱۰/۱ و ۹/۸ بود که در روز ۲۴ نگهداری ۴۳/۵، ۳۴/۸، ۳۲ و ۲۶/۸ mg N/100g Flesh شد. نمونه شاهد بیشترین و نمونه پوشش دهی شده با کیتوزان حاوی اسانس کمترین میزان بازهای ازته فرار را طی دوره نگهداری داشته است. اختلاف بین تیمارها به جز روز صفر نگهداری معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$). وجود ترکیبات ضدمیکروبی و ضداکسایشی در اسانس و عصاره گیاهان باعث کاهش جمعیت باکتریایی و یا کاهش ظرفیت باکتری‌ها برای دآمیناسیون اکسیداتیو نیتروژن غیرپروتئینی ترکیبات و یا هر دوی آن‌ها می‌شود (Fan et al., 2008). چنین نتایجی در مطالعه تهیه و ارزیابی فیلم زیست تخریب پذیر کیتوزان و اسانس دارچین بر کیفیت قزل‌آلای رنگین کمان (Ojagh et al., 2010) و افزایش ماندگاری ماهی کپور با استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی طی دوره نگهداری در یخچال (Li et al., 2012) مشاهده شد. اسانس آویشن شیرازی به علت داشتن ترکیبات فنولی مانند تیمول و کارواکرول، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی باکتریایی بسیار خوبی می‌باشد.



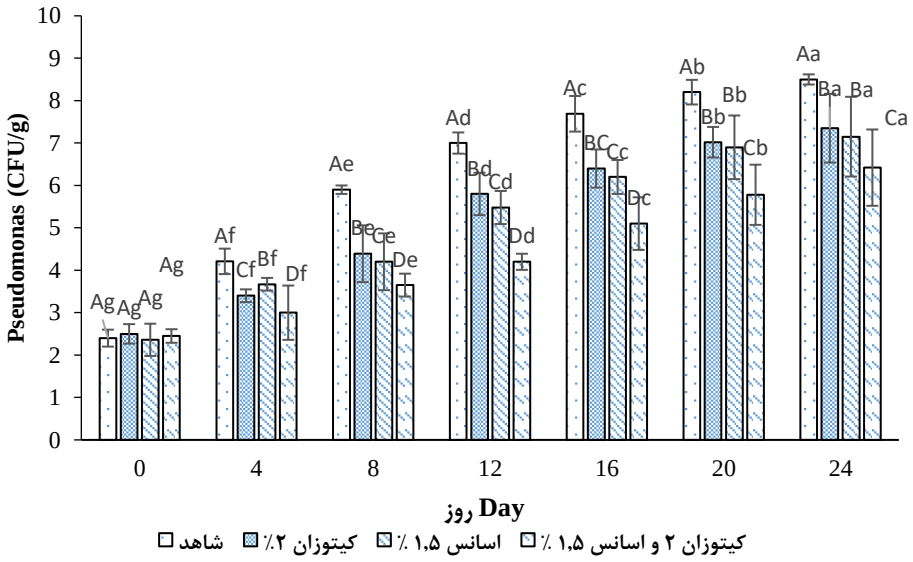
شکل ٤- تغییرات تعداد باکتری‌های مزوفیل (CFU/g) تیمارهای فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال (حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد).

Fig. 4. Changes in the mesophilic bacteria (CFU/g) of chicken fillet treatments during the period of storage in the refrigerator

شمارش باکتری‌های مزوفیل (TMC) و سودوموناس در فیله مرغ

کنترل میکروارگانیسم‌های ویژه فساد (SSOs)، بهداشت و ایمنی مواد غذایی چالشی بسیار مهم در صنعت غذا محسوب می‌شود. استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی جایگزینی سالم و مناسب نسبت به نگهدارنده های سنتزی جهت حفظ کیفیت و نگهداری مواد غذایی می‌باشند (Elizaquível et al., 2013). به‌طور کلی تعداد باکتری‌های مزوفیل و سودوموناس (شکل ۴ و ۵) طی دوره نگهداری در یخچال روند افزایشی داشته است به نحوی که در روز صفر نگهداری در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ و تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به ترتیب تعداد باکتری‌های مزوفیل CFU/g ۳/۴۵، ۳/۲۲، ۳/۳۴ و ۳/۴۱ بود و در پایان دوره ۸/۶۷، ۷/۶۸، ۷/۳ و ۶/۷ شد با توجه به این که سازمان دامپزشکی حد مجاز باکتری‌های مزوفیل در فیله مرغ را 7^{1} cfug- تعیین نموده است. بنابراین تعداد باکتری‌های مزوفیل در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به‌ترتیب در روزهای ۱۲، ۲۰ و ۲۰ از حد مجاز فراتر رفته است ولی تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ تا پایان دوره

نگهداری در یخچال کمتر از حد مجاز بوده است (p<۰/۰۵). بیشترین میزان رشد باکتری‌های مزوفیل در نمونه شاهد مشاهده گردید. تعداد باکتری‌های سودوموناس در روز اول نگهداری در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ و تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به‌ترتیب CFU/g ۲/۴، ۲/۵، ۲/۳۶ و ۲/۴۵ بوده است و تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد (p>۰/۰۵). به تدریج با افزایش زمان نگهداری بر تعداد باکتری‌ها افزوده می‌شود به‌طوری که در روز ۲۴ نگهداری در تیمار شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ و تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به‌ترتیب به ۸/۵، ۷/۳۵، ۷/۱۵ و ۶/۴۵ رسیده و اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). تعداد باکتری های سودموناس در تیمار شاهد در روز ۸ و در تیمارهای کیتوزان ۲٪ و آویشن شیرازی ۱/۵٪ در روز ۱۶ و تیمار فیله مرغ پوشش داده با کیتوزان ۲٪ حاوی اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ در روز ۲۴ از حد مجاز فراتر رفته است.



شکل ۵- تغییرات تعداد باکتری های سودوموناس (CFU/g) تیمارهای فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال (حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد).

Fig. 5. Changes in Pseudomonas bacteria (CFU/g) of chicken fillet treatments during the storage period in the refrigerator

Kashiri و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی خاصیت ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی را با استفاده از روش‌های حداقل غلظت کشندگی (MBC) و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بررسی نمودند، مشخص شد که اثرات ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی را می‌توان به ترکیبات کارواکرول و تیمول و توانایی آنها در برقراری پیوندهای هیدروژنی این ترکیبات با سایر مونوترپن‌ها نظیر گاماترپنین‌ها و بروز اثرات سینرژیستی نسبت داد که در نهایت منجر به بی‌ثباتی غشاء سلولی باکتری ها می‌گردد (Kashiri et al., 2016). اسانس آویشن شیرازی به دلیل دارا بودن ترکیب فنولی کارواکرول و تیمول دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و E.coli است که تأییدکننده نتایج تحقیق می‌باشد (Elizaquível et al., 2013). ترکیبات ضدمیکروبی فرار اسانس از طریق مهاجرت در فضای موجود در بسته‌بندی و ترکیبات ضدمیکروبی غیرفرار به صورت مواد حل شونده در تماس بین ماده بسته‌بندی و غذا می‌توانند اثرات ضدمیکروبی خود را بروز دهند (Shan et al., 2007). لذا در نمونه‌های فیله مرغ تیمار شده با پوشش کیتوزان و اسانس آویشن شیرازی به دلیل وجود ترکیبات فنولی در آویشن طی دوره نگهداری از طریق پوشش به گوشت وارد می‌شوند و بر باکتری‌های گوشت اثرات ضدمیکروبی خود را وارد می کنند از طرفی پوشش کیتوزان هم دارای خاصیت ضدمیکروبی و ضداکسایشی می‌باشد. اندازه گیری فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی توسط Calatayud و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد و اعلام نمودند که اسانس در محیط‌های مایع عملکرد بسیار خوبی دارند (Calatayud et al., 2013). میزان رهایش ماده موثره و شدت کاهش جمعیت میکروبی به نوع پوشش استفاده شده نیز بستگی دارد لذا زمانی که اسانس در ساختار پوشش قرار می‌گیرد رهایش بهتری دارد و اثرات ضدمیکروبی آن بالاتر است (Muriel-Galet et al., 2012). استفاده

از پوشش خوراکی کیتوزان و پکتین غنی شده با اسانس لیمو و فلفل عمر ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلا را افزایش داد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Tabatabaei moradi et al., 2015). این نتایج حاصل فعالیت مواد ضدمیکروبی و ضداکسایشی اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان، که با ایجاد اختلال در غشای سیتوپلاسمی، نیروی محرکه پروتونی، جریان الکترون‌ها، انتقال فعال و انعقاد محتویات سلول، اثرات خود را اعمال می‌کنند، می‌باشد (Burt, 2004, Prashanth and Tharanathan, 2007).

نتیجه‌گیری

استفاده از پلیمرهای زیستی مانند کیتوزان، ژلاتین و غیره که توانایی خوبی در نگهداری و رهاییش ترکیبات ضداکسیدانی و ضدمیکروبی دارند، در بسته‌بندی مواد غذایی رو به افزایش می‌باشد. در این پژوهش اثرات نگهدارندگی پوشش کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی در افزایش عمر ماندگاری فیله مرغ بررسی شد و مشخص گردید که پوشش کیتوزان و اسانس آویشن شیرازی به تنهایی و به صورت توأم، اثرات نگهدارندگی خوبی داشته‌اند. با توجه به نتایج، پوشش ۲٪ کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ می‌تواند عمر ماندگاری فیله مرغ را افزایش دهد که این نتیجه ناشی از عملکرد خیلی خوب پوشش کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی به دلیل وجود اثر هم‌افزایی در خواص ضدمیکروبی و ضداکسایشی بین پوشش کیتوزان و اسانس آویشن در جلوگیری از رشد میکروبی و فساد شیمیایی بودو مدت ماندگاری برای تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪، و پوشش کیتوزان ۲٪ حاوی اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به‌ترتیب ۸، ۱۶، ۱۶ و ۲۴ روز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم موسسه آموزش عالی رودکی که در انجام این پروژه همکاری نموده‌اند، کمال تشکر را داریم

منابع

1. Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Allured publishing corporation Carol Stream, IL. 60188, USA ISBN 0-931710-85-5 2001. 469pp.
2. Al-bahri, A. Denaro, M Barreca D. et al. (2017). In vitro evaluation of the antioxidant, cytoprotective, and antimicrobial properties of essential oil from *Pistacia vera* L. variety bronte hull, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1212- 21. https://doi.org/10.3390/ijms18061212
3. Alizadeh Behbahani , B., Shahidi, F., TabatabaeiYazdi, 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
4. Arya, A., Mendiratta, S., Agarwal, R., Bharti, S. & Umarao, P. (2019). Antimicrobial profile and organoleptic acceptability of some essentials oils and their blends in hurdle treated chicken meat spread. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 8, 2162-2177.
5. Babuskin, S., Babu, P. A. S., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M. & Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International journal of food microbiology*, 171, 32-40. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.011
6. Bagamboula, C., Uyttenaele, M. & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigellasonne*i and *S. flexneri*. *Food microbiology*, 21, 33-42. https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7
7. Balamatsia, C. C., Rogga, K., Badeka, A., Kontominas, M. G. & Savvaidis, I. N. (2006). Effect of low-dose radiation on microbiological, chemical, and sensory characteristics of chicken meat stored aerobically at 4°C. J*ournal of food protection*, 69, 1126-1133.
8. Behnam, B. & Aliakbarlo, J. (2013). Antioxidant effect of thyme essential oil and oregano on chicken meat kept at 4ºC. *Food Industry Research* (*Agricultural Knowledge*), 23, 533-543.
9. Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239, 70-76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292
10. Burt, S. (2004). Essential oils :their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. I*nternational journal of food microbiology*, 94, 223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
11. Cakli, S., Taskaya, L., Kisla, D., Çekil, U., Atamann, C. A., Cadun, A., Kilinc, B. & Maleki, R. H. (2005). Production andquality of fish fingers from different fish species. *European Food Research and Technology*, 220, 526-530. https://doi.org/10.1007/s00217-004-1089-9
12. Calatayud, M., Lopez-de-dicastillo, C., Lopez-Carballo, G., Velez, D., Hernandezmunoz, P. & Gavara, R. (2013). Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. *Food Chemistry*, 139, 51-58. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.097

13. Dorman, H., Peltoketo, A., Hiltunen, R. & Tikkanen, M. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry*, 83, 255-262. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.036
14. Elizaquivel, P., Azizkhani, M., Sanchez, G. & Aznar, R. (2013). Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil activity against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables .*Food contro*l, 34, 770-776. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.036
15. Fan, W., Chi, Y. & Zhang, S. (2008). The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmicthys molitrix*) during storage in ice. *Food chemistry*, 108, 148-153.
16. Fazlara, A., Pourmehdibroujni, M. & Molaei, F. (2017). The effect of Shirazi-Thyme gelatin coating on microbial, chemical and sensory properties of ostrich fillets in refrigerated conditions. *Iranian Food Science and Technology*, 14, 141-155.
17. Fisher, P., Hoffman, L. C. & Mellett, F. D. (2000). Processing and nutritional characteristics of value added ostrich products. *Meat Science*, 55, 251-4. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00139-4
18. Giatrakou, V., Ntzimani, A. & Savvaidis, I. N. (2010). Combined chitosan-thyme treatments with modified atmosphere packaging on a ready-to-cook poultry product. J*ournal of Food Product*, 73, 663-9.
19. Gill, C. O, (1983). Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *Journal of Food Protection*, 46, 444-452.
20. Gimenez, B., Roncales, P. & Beltran, J. A. (2002). Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1154-1159.
21. Girolami, A., Marsico, I., D'andrea, G., Braghieri, A., Napolitano, F. & Cifuni, G. (2003). Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of ostrich meat as influenced by age at slaughter and muscle type. *Meat Science*, 64, 309-315. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00202-4
22. Gram, L. & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products .International Journal of Food Microbiology, 33, 121-37. https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8
23. Hajypourdehbalaei, S., Afsharmanesh, M. & Sami, M. (2015). The effect of thyme essential oil, oregano and their mixture on the quality of quail meat in comparison with the antibiotic virginiamycin. *Food Hygiene*, 5, 45-54.
24. Hosseini, M. M., Sedaghat, N., Khoshnodnia, S., Habibinajafi, M. & Kouchaki, A. (2014). Physical and mechanical properties of carboxymethylcellulose film containing plant essential oil and its effect on mutton color. *Food Industry Research* (Agricultural Knowledge), 24, 519-529.
25. Ionescu, A., Aprodu, I. & Pascaru, G. (2008). Effectof Papainand Bromelinonmuscleandcollagen proteinsin beef meat. Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI-*Food Technology*, 1, 9-16.
26. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Holistic approach to total count of microorganisms- Colony count technique at 30 degrees Celsius. National Standard No. 5272.
27. Jeon, Y.J., Kamil, J. Y. & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 5167-5178.
28. Hassanzadeh, P., Tajik, H. and Razavi Rohani, M. (2011). Application of chitosan edible coatingcontaining grape seed extract on the quality and shelf life of refrigerated chicken meat. *Journal of Food Industry Researc*h, 21 (4), 467-482.
29. Kashiri, M., Maghsoudloo, Y., Khamiri, M. & Behrooz, R. (2016). Evaluation of antibacterial properties of bioactive zein film containing *Zataria multiflora* essential oil. *Iranian Food Science and Technology*, 13, 195-206.
30. Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N. & Kontominas, M. G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, 26, 475-82. https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.008
31. Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X ,.Li, X. & Zhao, J. (2012). Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food Chemistry*, 135, 140-145. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.115
32. Moradi, M., Tajik, H., No, H. K., Razavi Rohani, S., Oromiehie, A. & Ghasemi, S. (2010). Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. *Journal of Chitin &Chitosan*, 15, 35-45.
33. Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., Lopez-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R. & Hernandez-Munoz, P. (2012). Development of antimicrobial filmsfor microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 195-201. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.002
34. Nosratollahi, K. Barzegar, H. Jooyandeh, H. Ghorbani, M. R. (2018). Effect of savory (*Satureja hortensis*) extract on the quality and shelf-life of raw chicken meat stored at refrigerator. *Journal oF food Science and Technology*, 82(15), 167-177.

35. Nouri, N., Rokni, N., Basti, A. Z., Misaghi, A., Dabbaghmoghadam, A., Yahyarait, R. & Ghanbari Saqarloo, N. (2012). Antimicrobial effect of Zataria multiflora essential oil on *E.coli* O157: H7 in ground beef during storage at refrigerated temperature to be replaced with chemical preservatives and to ensure consumer health. *Journal of Army University of Medical Sciences of the Islamic Republic of Iran*,10(3), 192-197.
36. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food chemistry*, 120, 193-198. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.006
37. Pikul, J., Leszczynski, D. E. & Kummerow, F .A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1309-1313.
38. Prashanth, K. H. & Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in food science & technology*, 18, 117-131. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022
39. Ojagh S. M, Rezaei M, Razavi S. H, Hosseini S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *FoodChemistry*, 122, 161- 166. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033
40. Rao, M., Kanatt, S., Chawla, S. & Sharma, A. (2010). Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*,82, 1243-1247. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.058
41. Rahmani, S., Nikpour, H., Sharifian, A. (2018). Application of garlic essential oil and sour lemon peel in the structure of active food coating based on starch in order to increase the shelf life of milk fish fillets. Congress for the Development of Regional Scientific Cooperation in Food Industry and Agriculture, COI: CFAS01_368, 21
42. Razavi Shirazi, S. H. (2007). Seafood Technology Principles of Maintenance and Processing, 382.
43. Rezaie, M., Farnoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A. & Golmohamadzadeh, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (Pistacia atlantica subsp. mutica) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food chemistry*, 173, 577-583. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.081
44. Ruiz-Capillas, C. & Moral, A. (2001). Residual effect of CO_2 on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, 212, 413-420. https://doi.org/10.1007/s002170000270
45. Saki, J., Khodanazary, A., Hosseini, S. M. (2017). The effect of chitosan-gelatin composition and bi-layer coating and film on physicochemical, microbial and sensory properties of johnius belangeriistored at refrigerator. J*ournal of Research and Innovation in Food Science and Industry*,6 (1), 71-86.Doi: 10.22101/JRIFST.2017.05.22.616
46. Sales, J. (1998). Fatty acid composition and cholesterol content of different ostrich muscles. *Meat Science*, 49, 489-92. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00052-7
47. Seydim, A. C., Acton, J .C., Hall, M. A. & Dawson, P. L. (2006). Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Science*, 73, 503-10. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.01.010
48. Shan, B., Cal, Y. Z., Brooks, J. D. & Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomumburmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 55, 5484-90.
49. Singh, S., Das, S., Singh, G., Schuff, C., De-Lampasona, M. P. & Catalan, C. A. (2014). Composition, in vitro antioxidant and antimicrobialactivities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigellasativa* L.). B*iotechnology Medical research international*, 1-11.
50. Tabatabaeimoradi, L., Sharifian, A. & Larijani, K. (2015). Antimicrobial activity of lemon and peppermint essential oil in edible coating containing chitosan and pectin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 3, 38-43.
51. Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K. K., Kaur, S. & Dhilon, G. S. (2017). Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Critical Review in Biotechnolcal*, 37, 476-491. https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1185388
52. Vernozy-Rozand, C., Ray-Gueniot, S., Ragot, C., Bavai, C., Mazuy, C., Montet, M. P., Bouvet, J. & Richard, Y. 2002. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef. *Lettersin Applied Microbiology*, 35, 7-11.
53. Vilela, G. R., Dealmeida, G. S., Darce, M. A. B. R., Moraes, M. H. D., Brito, J. O., Da Silva, M. F. D. G., Silva, S. C., De Stefanopiedade, S. M., Calori-Domingues, M. A. & Da Gloria, E. M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from Eucalyptus globulus Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and Aspergillus parasiticus Speare. *Journal of Stored Products Research*, 45, 108-111. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.10.006
54. Yanishlieva, N. V., Marinova, E. & Pokorny, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of lipid science and Technology*, 108, 776-793. https://doi.org/10.1002/ejlt.200600127

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 397- 413

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۱۳-۳۹۷

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

Full Research Paper

Optimization of ammonium phosphate, potassium sulfate and *Saccharomyces cerevisiae* in the production of acetic acid in a batch fermentor using Response Surface Methodology

Marjan Teimorimanesh[1], Hajar Abbasi[2*]

Received: 2021.05.08
Revised: 2021.06.24
Accepted: 2021.07.05
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Teimorimanesh, M., Abbasi, H. (2022). Selection and optimization of ammonium phosphate, potassium sulfate and *Saccharomyces cerevisiae* in the production of acetic acid in a batch fermenter using Response Surface Methodology. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 397-413.

Abstract

Introduction: Vinegar is an ancient fermented food consumed by human since Babylons period. It is a condiment that produced from various carbohydrate sources by alcoholic and subsequently acetic acid fermentation. Alcoholic fermentation is carried out by *Saccharomyces cerevisiae*, while the acetic acid fermentation is performed by acetic acid bacteria. Most of the acetic acid bacterial strains are classified in the *Acetobacter* genus and derived from vinegar factories that are able to oxidize ethanol to acetic acid and some strains over oxidize acetic acid into CO_2 and H_2O (over-oxidation). In acetic acid fermentation, important physical parameters that affect the growth of *A.aceti* are temperature, aeration and pH. Other most important factors for enhancing production efficiency of acetic acid are the nutrients of substrate for increases microbial activity. Considering the significant role of carbon sources and micronutrients in the fermentation culture to increase the production of acetic acid, in the present study, the effect of adding ammonium phosphate (0- 0.75 g), potassium sulfate (0- 0.75 g) and *Saccharomyces cerevisiae* (0- 1.5 g), were investigated to increase the production of acetic acid using *Acetobacter spp*.

Materials and methods: Yeast (*Saccharomyces cerevisae*) was obtained from the Iranian Research Organization for Science and Technology, Department of Biotechnology in Tehran, Iran with code number 5052. All chemicals were from Merck Co. Acetic acid production was performed by *Acetobacter* spp in a fermenter (Biostat B B.Brun) with a capacity of 10 L which contained 5000 ml of fermentation culture in 9.9 acidity. Mash with a capacity of 3000 ml containing 450 ml of vinegar with 9.9 acidity, 350 ml of ethanol 97%, 2.1 g of dextrose and the rest up to 3000 ml of water was produced and 300 ml of it was injected into the fermenter every 4 hours (in 10 steps). After complete injection, the fermentation operation continued for 9 hours. Agitation speed, aeration rate and temperature in the fermenter were 900 rpm, 50 L/min and 32°C, respectively. Determination of the best conditions for producing acetic acid was performed by Response Surface Methodology (RSM) in the form of central composite design. Independent variables were yeast concentration (0- 1.5 g), concentration of the ammonium phosphate (0- 0.75 g), and the potassium sulfate concentration (0- 0.75 g). RSM models were developed and optimization was done for the highest acidity, activity and oxidation value and the lowest residual alcohol content in the product. Optimal and control samples were examined in terms of qualitative characteristics such as acidity, activity, residual alcohol content, oxidation value, total

1. Former M.Sc. student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
(*Corresponding Author Email: h.abbasi@khuisf.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70315.1043

dissolved solids, reducing sugar, total phenol, ascorbic acid, sulfur dioxide and heavy metals. Comparison of the optimal and control samples was done in a completely randomized design using SAS ver: 9.1 software.

Results and discussion: The results showed that increasing the concentration of yeast and ammonium phosphate led to increase the initial and final acidity, activity and oxidation value and decrease the amount of residual alcohol. The effect of increasing potassium sulfate was negative and reduced the initial and final acidity, activity and oxidation value. However, interaction effects of potassium sulfate concentration with other variables at its intermediate levels on reducing the amount of residual alcohol in the product was positive. The optimal levels of the studied variables were determined as 1.5 g of *Saccharomyces cerevisiae*, 0.75 g of ammonium phosphate and 0.38 g of potassium sulfate. In control sample (without the independent variables), initial and final acidity, activity and oxidation index were lower and the residual alcohol content was higher than the standard level. Therefore, the optimal sample was compared with the control and using industrial activator (Astasome). The optimal sample in terms of initial and final acidity, activity, residual alcohol content and oxidation value had not a significant difference ($p > 0.05$) with the control sample (containing Astasome). Moreover, the optimal and control samples were not significantly difference in ascorbic acid and reducing sugar ($p > 0.05$), while the optimal sample in terms of total phenol content, sulfur dioxide and heavy metals like lead, zinc and copper was superior compared to the control sample ($p < 0.05$). Overall, the results of this study indicated the positive effect of yeast, ammonium phosphate, and the potassium sulfate at suitable concentration on qualitative characteristics of acetic acid.

The results revealed that using of appropriate amounts of *Saccharomyces cerevisiae*, ammonium phosphate and potassium sulfate in substrate as a source of micronutrients improve quality of acetic acid production by *Acetobacter spp*.

Keywords: Acetic acid, *Acetobacter*, *Saccharomyces cerevisiae*, Response surface methodology.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 397- 413

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۱۳-۳۹۷

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی تاثیر و بهینه‌یابی کمیت فسفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* در تولید اسید استیک در فرمانتور ناپیوسته با استفاده از روش سطح پاسخ

مرجان تیموری‌منش[۱]- هاجر عباسی[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۴/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴

چکیده

تولید سرکه شامل دو مرحله تخمیر الکلی و اکسیداسیون استیکی می‌باشد. یکی از بارزترین عوامل مؤثر در افزایش راندمان تولید اسید استیک، مواد مغذی موجود در سوبسترا جهت فعالیت بیشتر میکروارگانیسم است. در این پژوهش اثر افزودن فسفات آمونیوم (۰/۷۵- صفر گرم)، سولفات پتاسیم (۰/۷۵- صفر گرم) و مخمر ساکارومایسز سرویزیه (۱/۵- صفر گرم) با هدف افزایش راندمان تولید اسید استیک توسط استوباکتر مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی با چهار نقطه مرکزی ایجاد و پس از سپری شدن مراحل تولید، از نظر اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت، الکل باقی مانده و اندیس اکسیداسیون ارزیابی شدند. شرایط بهینه متغیرهای مستقل مشخص گردید و نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های کیفی محصول منتخب (مواد جامد نامحلول، قند احیاء، فنول کل، اسید آسکوربیک، دی‌اکسید گوگرد و فلزات سنگین) با نمونه شاهد مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش غلظت مخمر و فسفات آمونیوم باعث افزایش اسیدیته اولیه و نهایی، فعالیت و اندیس اکسیداسیون و کاهش میزان الکل باقی مانده در محصول می‌شود. اثر افزایش غلظت سولفات پتاسیم خصوصا در سطح بالای مورد بررسی بر اسیدیته اولیه و نهایی، فعالیت و اندیس اکسیداسیون کاهنده ارزیابی گردید. سطوح بهینه متغیرهای مورد بررسی شامل ۱/۵ گرم مخمر *ساکارومایسز سرویزیه*، ۰/۷۵ گرم فسفات آمونیوم و ۰/۳۸ گرم سولفات پتاسیم در نظر گرفته شد. نمونه بهینه تولیدی از نظر اسیدیته اولیه و نهایی، فعالیت، میزان الکل باقی مانده و اندیس اکسیداسیون تفاوت معنی‌داری ($p>0.05$) با نمونه دارای فعال‌کننده صنعتی (آستازوم) نشان نداد. در حالیکه این نمونه دارای محتوی فنول کل بیشتر (۶/۵ mg/L) و میزان دی‌اکسید گوگرد (۶/۲۵ mg/kg)، سرب (۰/۰۰۷۵ mg/kg)، روی (۰/۴۵ mg/kg) و مس (۰/۲۲۵ mg/kg) کمتری نسبت به نمونه شاهد بود ($p<0.05$).

واژه‌های کلیدی: اسید استیک، استوباکتر، *ساکارومایسز سرویزیه*، روش سطح پاسخ.

مقدمه

کلمه سرکه برگرفته از واژه فرانسوی "Vinaigre" به معنی شراب ترش است. این محصول به روش‌های مختلف و با استفاده از مواد اولیه گوناگون قابل تولید است. براساس تعریف استاندارد ایران، سرکه فرآورده‌ای است که از تخمیر الکلی ملاس و سپس تخمیر استیکی الکل رقیق شده حاصل می‌گردد و بایستی دارای حداقل ۵٪ اسید استیک باشد (Sharifi et al., 2015). تولید سرکه شامل دو مرحله اساسی تخمیر الکلی و اکسیداسیون استیکی می‌باشد. عوامل مؤثر در مرحله تخمیر الکلی که کنترل آنها از اهمیت زیادی برخوردار است شامل نوع مخمر، غلظت قند، مواد مغذی، pH، غلظت اکسیژن محلول و درجه حرارت می‌باشد. از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در مرحله اکسیداسیون استیکی نیز می‌توان به نوع میکروارگانیسم، غلظت الکل، غلظت اکسیژن محلول و درجه حرارت اشاره نمود (Robert, 2006). سرکه اثرات مفیدی از جمله اثرات ضددیابتی، تحریک اشتها، خواص آنتی‌اکسیدانی، بهبود خستگی، تنظیم فشار خون و کاهش چربی و کلسترول خون با مهار اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (LDL) برای مصرف‌کنندگان به دنبال دارد (Sharifi et al., 2015). علاوه بر مصرف مستقیم سرکه، این محصول در فرآوری محصولات غذایی مختلف به‌عنوان نگهدارنده و طعم‌دهنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Budak et al., 2014). اسید استیک یکی از ساده‌ترین اسیدهای آلی است که دارای بوی تیز و مزه ترش است و به‌عنوان یکی از مواد حد واسط مهم در

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: h.abbasi@khuisf.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70315.1043

بسیاری از صنایع شناخته می‌شود. اسید استیک از روش‌های مختلف شیمیایی و تخمیر میکروبی توسط باکتری‌های تولیدکننده اسید استیک تولید می‌شود. تاکنون باکتری‌های تولیدکننده اسید استیک از مناطق مختلف جهان جدا شده و مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. سویه های بومی هر منطقه ممکن است دارای ویژگی‌های خاص خود باشند. از این‌رو پیشرفت فرایندهای تولید اسید استیک می‌تواند با مطالعه دقیق‌تر سویه‌های بومی، شرایط جغرافیایی و آب و هوایی مختلف همراه شود. در سال‌های اخیر، طبقه‌بندی باکتری‌های اسید استیک گسترش یافته و این میکروارگانیسم‌ها به ۱۵ جنس تقسیم شده‌اند.

در فرایندهای زیستی، تأمین مواد (منبع کربن و نیتروژن، مخمر، ریز مغذی‌ها) بخش عمده‌ای از هزینه‌های اولیه و اصلی را به‌خود اختصاص می‌دهند. تاکنون انواع کربوهیدارت‌ها و منابع نیتروژنی از جمله گلوکز، سوکروز، مالتوز، مانیتول، ملاس، ذرت، کاه و لاکتوز آب پنیر برای تولید اسیدهای مختلف از جمله اسید استیک، اسید سیتریک، پروپیونیک اسید و اسید لاکتیک به‌کار رفته‌اند (Sharifi et al., 2015). از مشخصه‌های بارز مخمرها و باکتری‌های مورد استفاده برای تولید اسیدهای مختلف، می‌توان به توانایی آنها در تخمیر سریع و کامل مواد خام و ارزان، نیاز به حداقل مواد نیتروژنی و بازدهی بالا برای تولید محصول اشاره کرد. مطالعات پیشین نشان داده است که عوامل متعددی نظیر نوع و غلظت منبع کربن، نوع و مقدار مخمر و استفاده از عناصر معدنی و ریز مغذی‌ها تأثیر زیادی در افزایش سرعت فرایند تخمیر و بازده تولید اسیدهای مختلف دارند (Ding & Tan, 2006). با توجه به گستردگی مصرف اسید استیک در صنایع مختلف و با هدف افزایش میزان تولید این اسید، تاکنون تحقیقات متعددی در خصوص نقش ریزمغذی‌ها و عوامل مختلف مؤثر در تخمیر اسید استیک بر تولید این محصول صورت گرفته است. Aguilar Uscanga و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که منابع کربن نقش قابل توجهی در بازده تولید اسید استیک دارند. این محققان از گلوکز، ملاس نیشکر، نیشکر تصفیه شده، آناناس و آب نیشکر و چغندرقند به عنوان منبع کربن استفاده کردند و به این نتیجه دست یافتند که بیشترین غلظت اسید استیک تولیدی، بازده تولید اسید استیک و همچنین راندمان تولید اتانول که به‌ترتیب برابر با ۰/۲۴ g/g، ۰/۱۴ g/L/h و ۱۴/۵ g/L هستند، زمانی به‌دست می‌آید که از ملاس نیشکر حاوی ۶۰ گرم بر لیتر سوکروز به عنوان منبع انرژی استفاده شده باشد (Aguilar Uscanga et al., 2006). Awad و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بهینه‌سازی فرایند تولید اسید استیک توسط *استوباکتر استی* گزارش نمودند که بالاترین میزان تولید اسید استیک (۵۳ g/L)، در حضور ۱۰۰ g/L گلوکز، ۵ g/L پپتون، ۱۲ g/L مخمر و ۱۴۴ ساعت تخمیر حاصل می‌آید (Awad et al., 2012). در تحقیق دیگری محققان به بررسی اثر محرک‌های رشد و ریزمغذی‌ها بر تولید اسید استیک پرداختند. نتایج آنها نشان داد که در ۵٪ غلظت اتانول، ۰/۵٪ دی پتاسیم فسفات و ۰/۲۵٪ آمونیوم سولفات بیشترین میزان اسید استیک تولید می‌شود (Joshi et al., 2016). Rosada (۲۰۱۸)، با مطالعه اثر غلظت قند اولیه (صفر، ۱۰، ۲۰٪ وزنی/ حجمی)، نسبت *ساکارومایسز سرویزیه* به استوباکتر (۳:۷، ۱:۱، ۷:۳) و سرعت اختلاط (۸۰، ۱۶۰ دور بر دقیقه) بر تولید اسید استیک، شرایط بهینه جهت دستیابی به حداکثر مقدار اسید استیک را غلظت صفر درصد گلوکز، نسبت ۳:۷ *ساکارومایسز سرویزیه* به استوباکتر، سرعت اختلاط ۱۶۰ دور بر دقیقه طی مدت ۱۰ روز تخمیر توصیه کردند (Rosada et al., 2018). Abdolalizadeh و همکاران (۲۰۱۰)، با بررسی اثر ۴ غلظت مختلف منبع ازت شامل عصاره مخمر (صفر، ۲، ۵، ۸ گرم بر لیتر)، پپتون (صفر، ۲، ۵، ۸ گرم بر لیتر) و سولفات آمونیوم (۵، ۸، ۱۲، ۱۵ گرم بر لیتر) بر راندمان تولید اسید لاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* به این نتیجه دست یافتند که با افزودن پپتون به محیط کشت، تولید اسید لاکتیک افزایش قابل توجهی می‌یابد (Abdolalizadeh et al., 2010). همچنین با افزایش غلظت عصاره مخمر و سولفات آمونیوم در محیط کشت، راندمان تولید اسید لاکتیک افزایش چشمگیری نشان داد. علاوه بر اهمیت غلظت اکسیژن محلول و منابع کربن مورد استفاده در محیط کشت تخمیر، محیط کشت باید با عناصر کم مقدار دیگری که جهت رشد و تخمیر مخمر ضروری هستند، غنی‌سازی شود که از مهم‌ترین آنها می‌توان به عناصر معدنی نظیر نیتروژن، فسفر، گوگرد و روی اشاره کرد. لذا، در پژوهش حاضر تأثیر عصاره مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* به‌عنوان محرک رشد فعالیت باکتری *استوباکتر استی* و غلظت‌های مختلف فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم به‌عنوان ریز مغذی و عناصر ریز مقدار جهت افزایش راندمان تخمیر و بازدهی تولید اسید استیک، و همچنین بهینه‌یابی متغیرهای مورد بررسی (غلظت فسفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و عصاره مخمر) در فرمانتور ناپیوسته برای دستیابی به تولید حداکثر غلظت اسید استیک با ویژگی‌های کیفی مناسب مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه *ساکارومایسز سرویزیه* (PTCC 5052) از بخش بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه، و در کلیه مراحل این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این پژوهش، با خلوص بالا از شرکت مرک (آلمان)، خریداری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

تولید اسید استیک توسط سویه مورد نظر در فرمانتور (Biostat B B.Brun) با گنجایش ۱۰ لیتر که حاوی ۵۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه با اسیدیته ۹/۹ بود، انجام گرفت. مش با ظرفیت ۳۰۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۴۵۰ میلی‌لیتر سرکه با اسیدیته ۹/۹، ۳۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۷٪، ۲/۱ گرم دکستروز، مخمر *ساکارومایسز سرویزیه*، فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم مطابق مقادیر ارائه شده برای تیمارهای مختلف (جدول ۱) و مابقی تا حجم ۳۰۰۰ میلی‌لیتر آب آماده شد و در فواصل زمانی ۴ ساعت یک بار ۳۰۰ میلی‌لیتر به فرمانتور تزریق شد. پس از تزریق کامل آن، عملیات تخمیر به مدت ۱۲ ساعت ادامه یافت.

سرعت اختلاط، میزان هوادهی و دمای فرمانتور به‌ترتیب، ۹۰۰ دور در دقیقه، ۵۰ لیتر در دقیقه و ۳۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. متغیرهای مستقل شامل درصد مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* (۱/۵- صفر درصد)، درصد فسفات آمونیوم (۰/۷۵- صفر درصد) و درصد سولفات پتاسیم (۰/۷۵- صفر درصد) درنظر گرفته شدند. برای ارزیابی تاثیر متغیرها و به‌دست آوردن نقطه بهینه، ۲۰ ترکیب مختلف از متغیرها آزمایش توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت (Design Expert) پیشنهاد گردید که سطوح متغیرهای مستقل و مقادیر متغیرهای وابسته اندازه‌گیری شده آنها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل در تیمارهای مختلف سطح پاسخ و مقادیر متغیرهای وابسته آنها

Table 1- Levels of independent variables in different treatments and the values of their dependent variables

Potassium sulfate (g) سولفات پتاسیم (گرم)	Ammonium phosphate (g) فسفات آمونیوم (گرم)	*Saccharomyces cerevisiae* (g) مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* (گرم)	Treatments تیمار
0.13	0.13	0.25	1
0.38	0.38	0.75	2
0.38	0.38	0.75	3
0.38	0.38	0.75	4
0.00	0.38	0.75	5
0.38	0.38	1.5	6
0.13	0.63	0.25	7
0.38	0.75	0.75	8
0.38	0.38	0.75	9
0.63	0.13	1.25	10
0.13	0.63	1.25	11
0.63	0.63	0.25	12
0.13	0.13	1.25	13
0.38	0.38	0.75	14
0.38	0.00	0.75	15
0.38	0.38	0.00	16
0.63	0.13	0.25	17
0.63	0.63	1.25	18
0.75	0.38	0.75	19
0.38	0.38	0.75	20

ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی

اندازه‌گیری اسیدیته

اندازه‌گیری اسیدیته نمونه‌ها در دو مرحله اسیدیته اولیه (بعد از ۹ ساعت تخمیر) و اسیدیته نهایی (بعد از ۱۲ ساعت تخمیر)، مطابق با روش استاندارد AACC – 02-31.01، و بر اساس تیتراسیون با سود نیم نرمال در مجاورت معرف فنل فتالئین انجام گرفت.

ارزیابی فعالیت

پارامتر فعالیت بیانگر افزایش اسیدیته در واحد زمان است، و از تفاوت اسیدیته اولیه و اسیدیته نهایی در یک محدوده زمان ۳ ساعت محاسبه می‌گردد (رابطه ۱). در این پژوهش میزان فعالیت برای تمامی تیمارها در واحد زمان ثابت (۳ ساعت) اندازه‌گیری گردید. از آنجایی که بین محدوده زمانی ۹ تا ۱۲ ساعت در فرایند تولید، شدت این تغییر چشمگیرتر است، ارزیابی این پارامتر در این بازه زمانی انجام گرفت.

(۱) زمان/ (اسیدیته اولیه- اسیدیته نهایی)= فعالیت

اندازه‌گیری الکل باقی‌مانده

میزان الکل باقی مانده مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۳۹۴ و طی دو مرحله تقطیر سرکه و سپس اکسید کردن آن و در نهایت اندازه‌گیری بی‌کرومات پتاسیم باقی‌مانده تعیین گردید. بدین منظور، ۱۰ میلی‌لیتر سرکه و ۶۰ میلی‌لیتر آب درون یک بالن تقطیر ۲۵۰ میلی‌لیتری مخلوط گردید. در حضور معرف فنل فتالئین، سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال قطره قطره به محلول اضافه گردید تا به رنگ ثابت (قرمز ارغوانی) برسد. فرایند تقطیر تا دستیابی به ۵۰ میلی‌لیتر محلول تقطیر شده انجام گرفت و با آب مقطر به حجم رسانده شد. در مرحله اکسید کردن، ۲۰ میلی‌لیتر سرکه تقطیر شده به درون یک ارلن مایر انتقال داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر محلول نیتروکرومیک به آن اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و حدود ۱ گرم یدور پتاسیم به محلول اضافه گردید و ید آزاد شده با تیوسولفات ۰/۱ نرمال تیتر شد. مقدار الکل باقی مانده (حجمی/ حجمی) مطابق رابطه ۲ به‌دست آمد.

(۲) الکل باقی‌مانده = ۰/۱۱۴ × (B –A)

در رابطه فوق، A: حجم تیوسولفات مصرفی برای نمونه و B: حجم تیوسولفات مصرفی برای شاهد می‌باشد.

تعیین اندیس اکسیداسیون

ارزش اکسیداسیون بیانگر سانتی‌متر مکعب پرمنگنات پتاسیم ۱/۱۰۰ نرمالی است که ۱۰۰ گرم از نمونه تحت شرایط استاندارد در مدت ۳۰ دقیقه مصرف می‌کند. برای اندازه‌گیری اندیس اکسیداسیون، ۵ میلی‌لیتر از نمونه به بالن انتقال داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک رقیق شده و ۱۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم پرمنگنات ۰/۰۰۲ مولار به آن اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن ۵ میلی‌لیتر محلول یدور پتاسیم ۱۰٪ افزوده شد و یدور آزاد شده با تیوسولفات ۰/۰۲ مولار و با استفاده از محلول نشاسته ۱٪ تیتر گردید. ارزش اکسیداسیون با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد (Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2003).

(۳) اندیس اکسیداسیون =۴۰× (B –A)

در رابطه فوق، A: حجم تیوسولفات مصرفی برای نمونه و B: حجم تیوسولفات مصرفی برای شاهد می‌باشد.

بررسی و مقایسه پارامترهای کیفی نمونه بهینه و شاهد

پس از مدل‌سازی و بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر تغییرات متغیرهای وابسته، سطوح مناسب متغیرهای مستقل تعیین و نمونه بهینه با استفاده از سطوح مناسب متغیرها تهیه گردید. نمونه‌های بهینه و شاهد از نظر ویژگی‌های کیفی از جمله میزان مواد جامد نامحلول، فلزات سنگین، اسید آسکوربیک، محتوی فنول کل، میزان قند احیاء و دی اکسید گوگرد مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

اندازه‌گیری مواد جامد نامحلول

میزان مواد جامد نامحلول مطابق با روش Dahdouh و همکاران (۲۰۱۶)، و بر اساس خشک کردن در آون تعیین شد (Dahdouh et al., 2016).

اندازه‌گیری فلزات سنگین

به‌منظور تعیین میزان فلزات سنگین، ابتدا ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ها با ۳ میلی‌لیتر مخلوط اسید کلریدریک ۶ نرمال و اسید نیتریک ۰/۱ نرمال (نسبت ۳:۱) هضم اسیدی شدند. محلول شفاف به‌دست آمده با استفاده از آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و محلول‌ها جهت اندازه‌گیری غلظت عناصر سنگین آماده شدند. غلظت فلزات سنگین سرب، آرسنیک، آهن، روی و مس، با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Avanta، شرکت GBC، ایتالیا) به‌ترتیب در طول موج‌های ۲۸۳/۳، ۱۹۳/۷، ۲۴۸/۳، ۲۱۳/۹ و ۳۲۴/۸ نانومتر تعیین شد (Balali-Mood et al., 2018).

اندازه‌گیری دی‌اکسید گوگرد

میزان دی‌اکسید گوگرد با روش یدومتری مستقیم فرآورده مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۴۳۰۸ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری اسید آسکوربیک

میزان ویتامین C مطابق با روش مصوب استاندارد AOAC-967/21 و بر اساس استخراج اسید آسکوربیک نمونه، با استفاده از محلول اسید اگزالیک ۲٪، و عیارسنجی با معرف ۲و ۶- دی کلروفنل ایندوفنل تا ظهور رنگ صورتی روشن تعیین شد. مقدار اسید آسکوربیک بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک بیان گردید.

اندازه‌گیری فنول کل

محتوی فنولیک کل بر اساس روش رنگ‌سنجی و با استفاده از معرف فولین سیوکالتو مطابق با روش ارائه شده توسط Hafzan و همکاران (۲۰۱۷) تعیین گردید. بدین منظور، ۳/۹ میلی‌لیتر آب مقطر،

۰/۱ میلی‌لیتر نمونه با ۰/۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتو (۱۰ برابر رقیق شده با آب) مخلوط شد. پس از ۶-۳ دقیقه، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۲۰ درصد به محلول اضافه و مخلوط گردید. جذب نوری محلول‌ها پس از گذشت ۳۰ دقیقه در تاریکی در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید. مقدار فنول کل موجود در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بر حسب اکی‌والان گالیک اسید در لیتر (mg/L) محاسبه شد (Hafzan et al., 2017).

اندازه‌گیری قند احیاء

اندازه‌گیری میزان قند احیاء مطابق با روش مصوب استاندارد AOAC 920.51، و بر اساس روش لین- آنیون و با استفاده از محلول‌های فهلینگ A و B انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این تحقیق، به‌منظور بررسی تأثیر متغیرهای مستقل شامل درصد مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* (A)، درصد فسفات آمونیوم (B) و درصد سولفات پتاسیم (C) بر پاسخ‌ها (اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت، الکل باقی مانده، اندیس اکسیداسیون) از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ورژن ۹ و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی با ۵ نقطه مرکزی استفاده شد. کلیه بررسی‌های آماری و معنی‌داری و یا غیرمعنی‌داری داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گردید. جست وجوی شرایط عملیاتی بهینه جهت دستیابی به پاسخ‌های مطلوب مورد نظر با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی انجام گرفت. در روش RSM پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار، برای هر متغیر وابسته مدلی با انحراف استاندارد (SD) و مجموع مربعات باقی مانده برآورد شده (PRESS) اندک و ضریب همبستگی (R^2) بالا تعریف می‌گردد و آثار اصلی و متقابل متغیرها بر فاکتور مربوطه را بیان می‌کند. همانطور که در معادله ۱ مشاهده می‌شود، برای پاسخ پیش‌بینی شده Y، ضریب ثابت β_0، اثرات خطی β_a، β_b، β_c، اثرات مجذور β_{aa}، β_{bb}، β_{cc} و اثرات متقابل β_{ab}، β_{ac}، β_{bc} تعریف می‌شوند.

$$Y=\beta_0+\beta_aA+\beta_bB+\beta_cC+\beta_{aa}A^2+\beta_{bb}B^2+\beta_{cc}C^2+\beta_{ab}AB+\beta_{ac}AC+\beta_{bc}BC \quad (۴)$$

آنالیز نتایج به‌دست آمده از مقایسه نمونه‌های بهینه و شاهد در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SAS ver: 9.0 صورت گرفت. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها و بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین داده‌ها، حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) میان آنها، در سطح اطمینان ۹۵ درصد تعیین گردید.

نتایج و بحث

برای به‌دست آوردن مدل تجربی برای پیش‌بینی متغیرهای پاسخ (اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت، الکل باقی‌مانده، اندیس اکسیداسیون) ابتدا رابطه‌های چند جمله‌ای خطی، دو فاکتوریلی (تعاملی)، درجه دو و درجه سه بر داده‌های به‌دست آمده از این پاسخ برازش داده شدند و سپس این مدل‌ها مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون عدم برازش آن معنی‌دار نبوده و دارای بالاترین ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده باشد. نتایج نشان داد مدل مناسب برای پیشگویی تغییرات اسیدیته اولیه (پس از گذشت ۹ ساعت تخمیر)، اسیدیته نهایی (بعد از ۱۲ ساعت تخمیر)، فعالیت و الکل باقی مانده در محصول در اثر تغیر کمیت متغیرهای مورد بررسی (غلظت مخمر، غلظت فسفات آمونیوم، غلظت سولفات پتاسیم)، مدلی درجه دو و برای تغییرات اندیس اکسیداسیون مدل خطی درجه اول با ضریب تبیین حدود ۰/۹۰ می باشد. نتایج تجزیه واریانس متغیرهای پاسخ در جدول ۲ آورده شده است.

تغییرات اسیدیته اولیه و نهایی

اسیدیته و pH معیارهای مناسبی جهت ارزیابی سرعت تخمیر استیکی محسوب می‌شوند. افزایش اسیدیته نشان‌دهنده تولید اسید استیک و تبدیل الکل به اسید می‌باشد (Ozturk et al., 2015). نتایج حاصل از جدول ۳ نشان می‌دهد که افزایش غلظت مخمر و غلظت فسفات آمونیوم اثر مثبت و معنی‌دار بر میزان اسیدیته اولیه و نهایی داشت، به‌طوریکه افزایش غلظت مخمر و غلظت فسفات آمونیوم سبب افزایش اسیدیته گردید. اثر متقابل غلظت مخمر و فسفات آمونیوم در مقادیر بالا نیز باعث افزایش اسیدیته اولیه و نهایی محصول گردید (شکل ۱- الف و ج). بر اساس ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره مخمر، مخمر نه تنها یک منبع نیتروژن آلی بلکه منبع عالی از بسیاری از ریز مغذی‌ها از جمله اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و فاکتورهای رشد با وزن مولکولی کم است. به همین علت افزایش تولید اسید استیک تابعی از غلظت مخمر به‌کار رفته در محیط کشت می‌باشد (Awad et al., 2012). از طرف دیگر، یکی از عوامل مهم و کلیدی در افزایش راندمان تولید اسید استیک، ترکیب مواد مغذی محیط تخمیر برای رشد و سوخت و ساز مخمر است که به شدت بر کیفیت محصول نهایی تأثیر می‌گذارد. لذا، افزایش اسیدیته و یا به عبارتی تولید بیشتر اسید استیک با افزایش غلظت فسفات آمونیوم را می‌توان اینگونه توضیح داد که افزایش نیتروژن معدنی (نمک آمونیوم) در محیط باعث می‌گردد که رشد مخمر سریع‌تر صورت گیرد و قند بیشتری از سوبسترا را برای تکثیر مصرف کند و درنهایت باعث افزایش سرعت تخمیر شود. اگرچه به‌نظر می‌رسد

مقادیر بالاتر فسفات آمونیوم عامل محدودکننده رشد باکتری استوباکتر بوده و سبب کاهش اسیدیته اولیه و نهایی شده است (Pooja & Soumitra, 2013).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات سطح مخمر، غلظت فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم بر ویژگی‌های کیفی (اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت، الکل باقی مانده، اندیس اکسیداسیون) اسید استیک

Table 2- Variance analysis of the effects of yeast level, ammonium phosphate and potassium sulfate concentration on the qualitative characteristics (initial acidity, final acidity, activity, residual alcohol, oxidation index) of acetic acid

	Response پاسخ									
	Initial acidity اسیدیته اولیه		Final acidity اسیدیته نهایی		Activity فعالیت		Residual alcohol الکل باقی مانده		Oxidation index اندیس اکسیداسیون	
Source of changes منبع تغییرات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات
Model مدل	6	19.07***	6	21.88***	8	0.01***	6	16.26***	6	4435391***
A	1	1.66***	1	2.27***	1	0.005***	1	2.40***	1	1657315***
B	1	9.63***	1	10.92***	1	0.002***	1	8.46***	1	1161027***
C	1	1.59***	1	2.01***	1	0.004***	1	1.13**	1	675072.4***
AB	1	0.85***	1	0.95***	1	0.001***	1	0.69**	1	714012.5***
AC	–	–	–	–	1	$8.19*10^{-5}$*	–	–	1	46512.5ns
BC	1	1.81***	1	1.86***	1	0.0003***	1	1.32**	1	132612.5*
A^2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
B^2	1	3.58***	1	3.93***	1	$5.41*10^{-5}$ns	1	2.27***	–	–
C^2	–	–	–	–	1	$6.8*10^{-5}$*	–	–	–	–
Residual باقی مانده	13	1.09	13	1.18	11	0.0001	13	0.97	13	304829.5
Lack of fit عدم برازش	1	0.74ns	8	0.83 ns	6	0.0001ns	1	0.62ns	8	268946.1ns
Total error خطای کل	5	0.35	5	0.35	5	$3.68*10^{-5}$	5	0.35	5	35883.33
Total کل	19	20.16	19	23.06	19	0.01	19	17.23	19	4740220

خطوط تیره در جدول نشان دهنده بی‌تأثیر بودن متغیر مربوطه در پاسخ‌های اندازه‌گیری شده است.

***: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ درصد، **: اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد، *: اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد.

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

The dark lines in the table indicate that the relevant variable has no effect on the measured responses.

***: significant difference at the 0.001%, **: significant difference at the 1% level, *: Significant difference at the 5%.

ns: no significant difference

جدول ۳- ضرایب مدل‌های برازش یافته بر صفات مورد مطالعه

Table 3- Coefficients of developed models on the studied parameters

Oxidation index اندیس اکسیداسیون	Residual alcohol الکل باقی مانده (٪)	Activity فعالیت	Final acidity اسیدیته نهایی (٪)	Initial acidity اسیدیته اولیه (٪)	Coefficient ضریب
			Response پاسخ		
1025.66***	1.55***	0.05***	9.78***	9.63***	β_0
324.97***	-0.39***	0.02***	0.38***	0.32***	β_1
271.90***	-0.73***	0.01***	0.83***	0.78***	β_2
-207.33**	0.27**	-0.02***	-0.36***	-0.23***	β_3
237.65***	-0.23**	0.01***	0.27***	0.26***	β_{12}
-60.66ns	–	-0.003*	–	–	β_{13}
102.42*	-0.32***	0.005***	0.38***	0.38***	β_{23}
–	–	–	–	–	β_{11}
–	0.37***	-0.002 ns	-0.49***	-0.47***	β_{22}
–	–	*-0.002	–	–	β_{33}
0.93	0.94	0.98	0.94	0.94	R^2
268946.10	0.62	0.0001	0.83	0.74	Lack of Fit

صفر: عرض از مبدا، ۱: غلظت مخمر، ۲: غلظت فسفات آمونیوم، ۳: غلظت سولفات پتاسیم.

*، **، *** به‌ترتیب، نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۹۵٪، ۹۹٪ و ۹۹/۹٪ و ns عدم معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد.

0: intercept 1: yeast concentration, 2: ammonium phosphate concentration, 3: potassium sulfate concentration

*, **, *** indicate significance at the probability level of 95%, 99% and 99.9% respectively and ns indicates non-significance.

بر طبق نتایج، اثر مستقل افزایش غلظت سولفات پتاسیم بر اسیدیته اولیه و نهایی محصول منفی و کاهنده ارزیابی شد (P<0.001). علت این امر می‌تواند به بازدارندگی یون پتاسیم و یا سولفور بر رشد و تخمیر *ساکارومایس سرویزیه* و همچنین برهم‌کنش‌های میان یون‌های فلزی موجود در محیط و اثر محدودکنندگی آنها در انجام واکنش نسبت داده شود (Gorji et al., 2007). البته همانطور که در شکل (۱- ب و د) مشاهده می‌شود، افزودن همزمان فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم، تاثیر مثبت بر تغییرات اسیدیته اولیه و نهایی محصول دارد. بررسی منابع در خصوص تاثیر سوبسترا بر فعالیت باکتری‌های تولیدکننده اسید، نشان از تاثیر متفاوت عناصر مختلف بر کمیت و کیفیت محصول دارد. در این راستا Haq و همکاران (۲۰۰۲)، نشان دادند که افزودن یون مس تأثیر مستقیمی در تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* دارد (Haq et al., 2002). در تحقیقی که توسط مظاهری اسدی و نیکخواه ممان (۲۰۰۳) در رابطه با تولید اسید سیتریک از تفاله خرما انجام گرفت، از فروسیانید پتاسیم جهت غنی‌سازی محیط تخمیر استفاده شد (Mazaheri Asadi, and Nikkhah Maman, 2003). نتایج نشان داد که استفاده از فروسیانید پتاسیم اثر محسوسی در افزایش راندمان تولید اسید سیتریک نداشت و اضافه کردن فروسیانید پتاسیم تا غلظت ۰/۷۵ گرم در هر کیلوگرم تفاله خرما فقط تا حد کمی آهنگ تولید اسید سیتریک را افزایش داده است. Nadeem و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش نمودند که با افزایش غلظت سوبسترا از ۱۰٪ تا ۱۵٪ بازده تولید سیتریک اسید توسط *آسپرژیلوس نیجر* افزایش در غلظت‌های بالاتر از ۱۵٪ کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای دیگر نتایج بیانگر آن بود که با افزایش غلظت سوبسترا (ذرت، سیب زمینی، سویا، بادام زمینی)، از ۲ به ۱۰ گرم میزان تولید اسید استیک و اسید بوتریک و همچنین غلظت قندهای احیاءکننده به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است (7Nadeem et al., 201). در میان غلظت‌های مورد بررسی، غلظت ۸ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر به عنوان شرایط بهینه جهت افزایش بازده تخمیر معرفی شد (Zhang et al., 2020).

تغییرات فعالیت

تغییرات فعالیت میزان افزایش اسیدیته در واحد زمان را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد که مدل درجه دوم به دست آمده از تغییرات فعالیت در تیمارهای مختلف معنی‌دار ارزیابی شد (P<0.001). اثرات متقابل متغیرهای مورد بررسی در سطح اطمینان ۹۹/۹ درصد معنی‌دار بود که نشان‌دهنده تأثیر توأم متغیرهای مستقل بر تغییرات فعالیت می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول ۳، مثبت بودن ضریب رگرسیون خطی غلظت مخمر و فسفات آمونیوم مؤید این مطلب است که با افزایش غلظت مخمر و فسفات

آمونیوم مصرفی، میزان فعالیت افزایش می‌یابد. درحالیکه، روند تغییرات میزان فعالیت با افزایش غلظت سولفات پتاسیم کاهشی بود (P<0.001). اثر متقابل غلظت مخمر و فسفات آمونیوم در محدوده نسبتا وسیعی از تغییرات هر دو متغیر به ویژه مقادیر بالاتر آنها موجب افزایش میزان فعالیت نمونه‌ها شده است (شکل ۱- ه) در حالیکه، اثر متقابل غلظت مخمر و سولفات پتاسیم در سطوح مختلف متفاوت بود. به‌نحوی که تا سطوح متوسط متغیرها، افزایش و پس از آن کاهش چشمگیر فعالیت مشاهده گردید (شکل ۱- و). اثر متقابل غلظت فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در مقادیر بالا نیز در افزایش میزان فعالیت تیمارها مثبت و معنی‌دار ارزیابی شد (شکل ۱- ز). به‌طور کلی باید اشاره داشت که اثر متقابل سولفات پتاسیم با سایر متغیرها و همچنین مقادیر متوسط آن بر تغییرات فعالیت مثبت بود. نتایج مطالعات متعدد حاکی از آن است که نوع و غلظت سوبسترا تأثیر به سزایی بر سرعت فرایند تخمیر و افزایش بازده تولید اسیدهای مختلف دارد. Cevrimli و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که با افزایش غلظت قند از ۵۰ تا ۱۴۰ گرم بر لیتر تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نیجر* افزایش و در غلظت‌های بالاتر از ۱۴۰ گرم بر لیتر بازده تولید اسید سیتریک کاهش می‌یابد (Cevrimli et al., 2009). نتایج تحقیقی دیگر نیز نشان داد که افزودن فروکتوز در محیط کشت حاوی سبوس جو و همچنین افزایش غلظت آن از ۵٪ تا ۲۰٪ موجب افزایش تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نیجر* شده است. درحالیکه با افزایش غلظت آمونیوم نیترات از ۰/۲۵٪ تا ۱٪ وزنی/حجمی روند کاهشی در تولید اسید سیتریک به‌دست آمده است (Rao & Reddy, 2013).

محتوی الکل باقی‌مانده

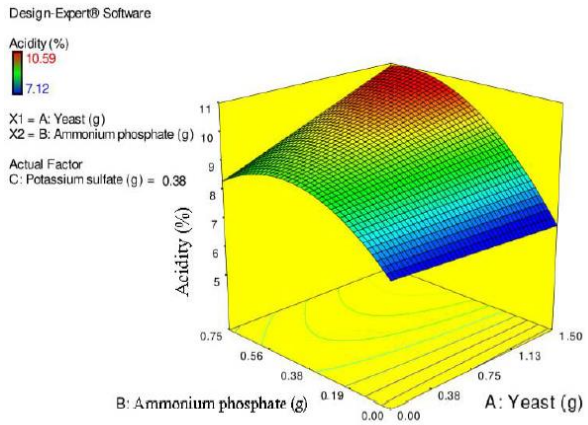
فرایند تولید سرکه شامل دو نوع فرایند تخمیری الکلی و استیکی می‌باشد. در مرحله تخمیر الکلی، کربوهیدرات‌های موجود در سوبسترا توسط مخمرها به الکل اتیلیک تبدیل می‌شود. در مرحله استیکی، الکل حاصل از مرحله قبل به‌عنوان سوبسترا توسط استوباکترها، طی فرایند اکسیداسیون به اسید استیک تبدیل می‌شود. ابتدا اتانول در حضور اکسیژن هوا به استالدئید تبدیل و سپس توسط آنزیم آلدئید دهیدروژناز باکتری به اسید استیک دهیدروژنه می‌گردد. بنابراین در فرایند تولید سرکه، الکل یک محصول حد واسط است که میزان تولید و مصرفش در زمان‌های مختلف تخمیر الکلی و استیکی متفاوت است، از این‌رو وجود الکل در مرحله پایانی فرایند تولید سرکه دور از انتظار نخواهد بود. میزان مجاز و حد قابل قبول الکل در سرکه مطابق با استاندارد ملی ۰/۵ درصد تعریف شده است (Nascimento et al., 2005). نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد که مدل درجه دوم به دست آمده از تغییرات محتوی الکل باقی مانده در محصول معنی‌دار ارزیابی گردید (P<0.001). معنی‌دار بودن اثرات متقابل برخی از متغیرهای مورد بررسی در سطح احتمال ۹۵ و ۹۹ درصد نشان‌دهنده تأثیر توأم متغیرها بر میزان الکل باقی مانده می‌باشد. منابع تغییرات مدل نشان می‌دهد، با افزایش غلظت مخمر و فسفات آمونیوم میزان الکل باقی مانده کاهش یافت (جدول ۳). این مشاهده به افزایش سرعت تخمیر الکلی و اکسیداسیون استیکی در حضور ریز مغذی‌های موجود در محیط مرتبط است (Maris et al., 2006). همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول ۳، روند افزایشی میزان الکل باقی مانده با افزایش غلظت سولفات پتاسیم مشاهده شد. به نظر می‌رسد که سولفات پتاسیم یک عامل محدودکننده رشد مخمر و باکتری استوباکتر در محیط بوده و باعث کاهش راندمان تبدیل الکل به اسید استیک شده است. غلظت‌های معینی از سولفات پتاسیم باعث تغییر شرایط محیط از حالت هوازی به بی‌هوازی شده است، و رشد و فعالیت استوباکتر که یک باکتری هوازی اجباری است را کند و یا متوقف کرده است (Gorji et al., 2007). اثرات متقابل غلظت مخمر و فسفات آمونیوم و محتوی فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم نیز کاهش معنی‌دار محتوی الکل باقی مانده در محصول را نشان می دهند (شکل ۱- ی، ۱- ح). در مجموع اثر متقابل سولفات پتاسیم با سایر متغیرها و همچنین مقادیر متوسط آن بر میزان الکل باقی مانده در محصول مثبت ارزیابی گردید. محققان بر این باورند که کاهش غلظت الکل باقی مانده در محیط با افزایش غلظت اسید (راندمان تولید اسید و افزایش اسیدیته) همراه است (Maris et al., 2006). نتایج برخی از مطالعات قبلی نیز مؤید این مطلب می‌باشد. به‌طور مثال، Sarkar و Das (۲۰۱۷)، اذعان داشتند که غنی‌سازی محیط کشت تخمیر با آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات موجب افزایش راندمان تولید اسید سیتریک نسبت به نمونه شاهد (حاوی ۱۵ گرم سوکروز) می‌شود. اما افزایش غلظت آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات از ۰/۲۵٪ تا ۱٪ راندمان تولید اسید را کاهش می‌دهد (Sarkar and Das, 2017). همچنین نتایج آنها نشان داد که با افزایش غلظت قند گلوکز و سوکروز از ۵٪ تا ۱۵٪ راندمان تولید اسید سیتریک افزایش می‌یابد و قند سوکروز نسبت به گلوکز در افزایش راندمان تولید اسید تأثیر بیشتری دارد.

تغییرات اندیس اکسیداسیون

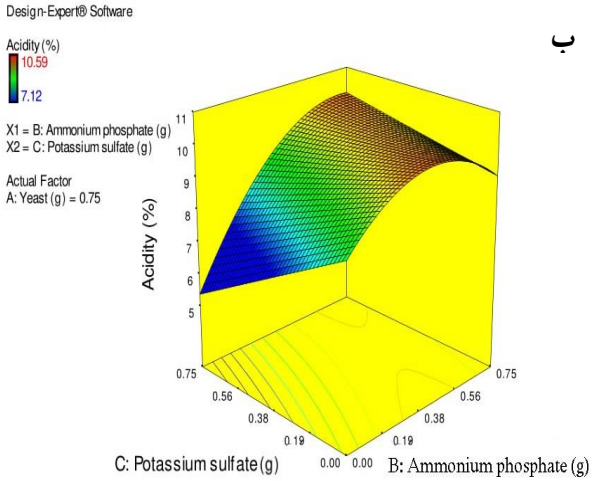
نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد که مدل خطی به‌دست آمده از تغییرات اندیس اکسیداسیون در تیمارهای مختلف معنی‌دار ارزیابی شد (P<0.001).

اثرات متقابل برخی از متغیرهای مورد بررسی نیز در سطح احتمال ۹۵ و ۹۹ درصد معنی‌دار بودند که نشان‌دهنده تأثیر توأم متغیرهای مستقل بر تغییرات اندیس اکسیداسیون می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول ۳ مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت مخمر و فسفات آمونیوم، اندیس اکسیداسیون به حداکثر مقدار خود می‌رسد که دلیل این مشاهده را می‌توان به غنی شدن محیط از مواد مغذی مورد نیاز برای رشد و فعالیت مخمر و باکتری استوباکتر نسبت داد که این امر به نوبه خود منجر به افزایش شدید فعالیت مخمر و استوباکتر و در نتیجه اسید استیک حاصل از آن می‌شود (Plessi, 2003). با توجه به نتایج جدول ۳، افزایش غلظت سولفات پتاسیم به‌دلیل اثر محدودکنندگی رشد مخمر و باکتری، ممانعت از تخمیر کامل قندها و طولانی شدن زمان تخمیر باعث کاهش اندیس اکسیداسیون تیمارها گردید (Ataye Salehi., 2010). همچنین به نظر می‌رسد که غلظت‌های مشخص سولفات پتاسیم به واسطه برهمکنش با یون‌های فلزی خصوصا آهن و منیزیم، باعث ایجاد اختلال در فرایند تخمیری تولید اسید استیک می‌شود (Rashidi and Mazaheri Asadi 2008). اثر متقابل غلظت مخمر و فسفات آمونیوم در مقادیر بالا در افزایش اندیس اکسیداسیون تیمارها مثبت و معنی‌دار ارزیابی شد (شکل ۱- ط).

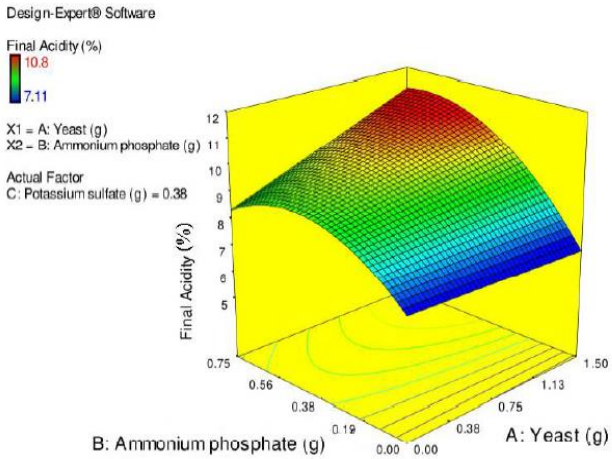
الف



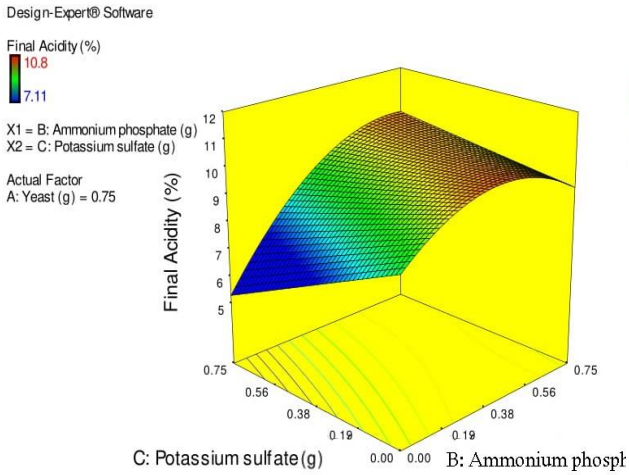
ب

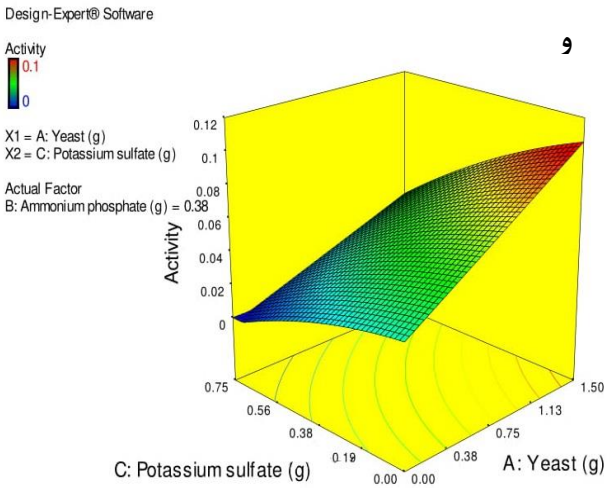


ج

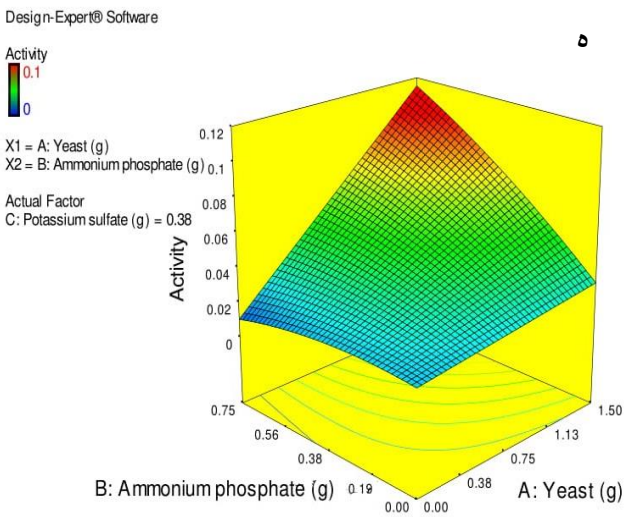


د

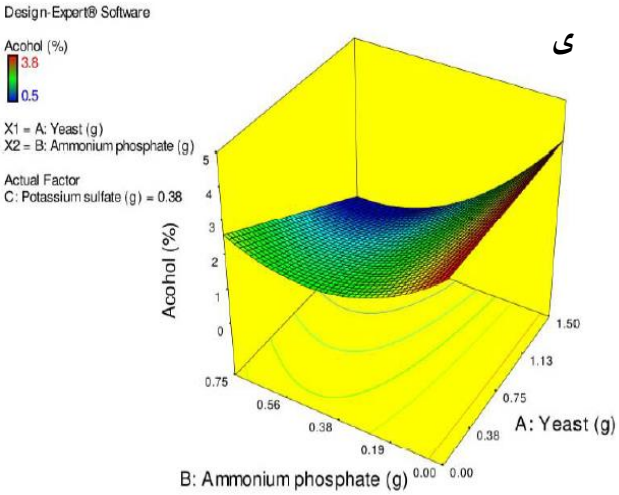



Design-Expert® Software
Activity
0.1
0
X1 = A: Yeast (g)
X2 = C: Potassium sulfate (g)
Actual Factor
B: Ammonium phosphate (g) = 0.38
Activity
C: Potassium sulfate (g)
A: Yeast (g)

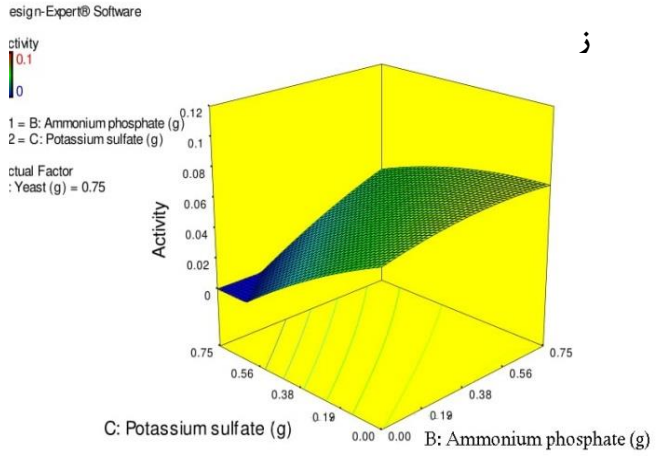
و


Design-Expert® Software
Activity
0.1
0
X1 = A: Yeast (g)
X2 = B: Ammonium phosphate (g)
Actual Factor
C: Potassium sulfate (g) = 0.38
Activity
B: Ammonium phosphate (g)
A: Yeast (g)

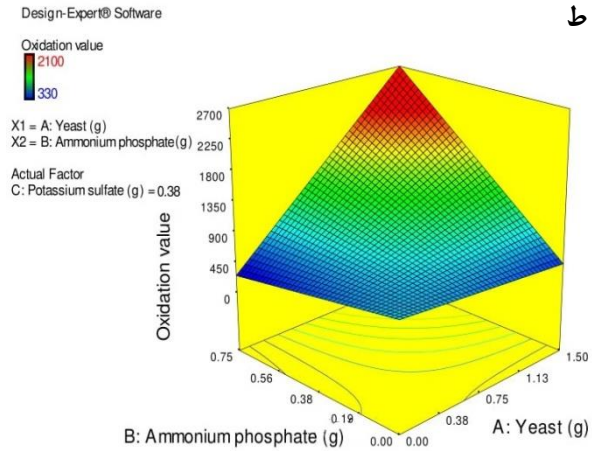
ه


Design-Expert® Software
Acohol (%)
3.8
0.5
X1 = A: Yeast (g)
X2 = B: Ammonium phosphate (g)
Actual Factor
C: Potassium sulfate (g) = 0.38
Acohol (%)
B: Ammonium phosphate (g)
A: Yeast (g)

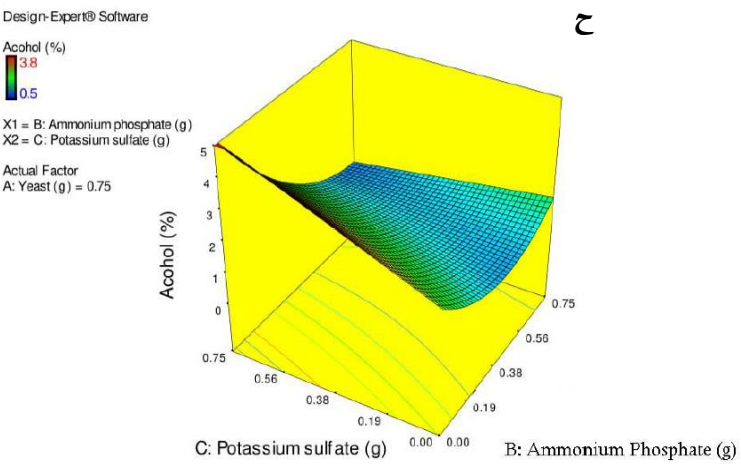
ی


esign-Expert® Software
ctivity
0.1
0
1 = B: Ammonium phosphate (g)
2 = C: Potassium sulfate (g)
ctual Factor
: Yeast (g) = 0.75
Activity
C: Potassium sulfate (g)
B: Ammonium phosphate (g)

ز

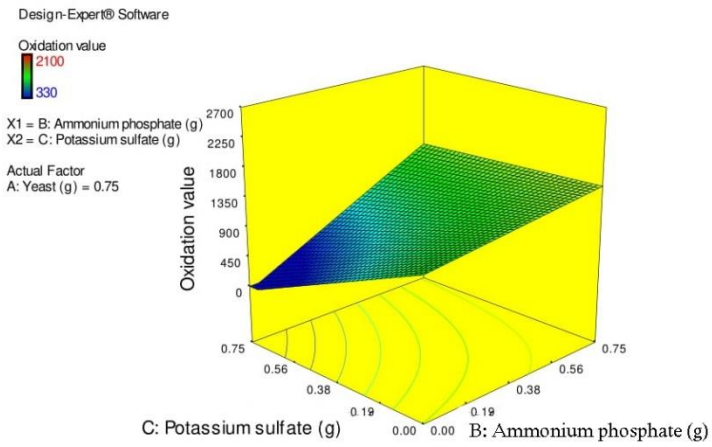

Design-Expert® Software
Oxidation value
2100
330
X1 = A: Yeast (g)
X2 = B: Ammonium phosphate (g)
Actual Factor
C: Potassium sulfate (g) = 0.38
Oxidation value
B: Ammonium phosphate (g)
A: Yeast (g)

ط


Design-Expert® Software
Acohol (%)
3.8
0.5
X1 = B: Ammonium phosphate (g)
X2 = C: Potassium sulfate (g)
Actual Factor
A: Yeast (g) = 0.75
Acohol (%)
C: Potassium sulfate (g)
B: Ammonium Phosphate (g)

ح

ق



شکل ۱- اثر متقابل متغیرهای مستقل بر تغییرات ویژگی‌های کیفی اسید استیک

Fig. 1. The interaction effect of independent variables on quality characteristics of acetic acid

شکل (۱- ق) نیز نشان می‌دهد که اثر متقابل غلظت فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در مقادیر بالا افزایش اندیس اکسیداسیون را به دنبال داشت. باید تذکر داشت که اثر متقابل سولفات پتاسیم با سایر متغیرها و همچنین مقادیر متوسط آن بر اندیس اکسیداسیون محصول مثبت به‌دست آمد. نتایج مطالعه Alben و Erkmen (۲۰۰۴)، در رابطه با تأثیر غلظت‌های مختلف آمونیوم نیترات بر راندمان تولید اسید سیتریک نشان داد که با افزایش غلظت آمونیوم نیترات راندمانو تولید اسید سیتریک افزایش می‌یابد، و همچنین سرعت تولید اسید سیتریک طی ۴ روز (فاز اول تولید) را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. از آنجایی که نیتروژن یک عامل محدودکننده در فرایند تخمیر اسید سیتریک است، تأثیر نیتروژن از طریق آمونیوم نیترات به‌دلیل متابولیزه شدن کامل آن طی فرایند تخمیر اثر به‌سزایی در افزایش راندمان تولید اسید سیتریک دارد (Alben and Erkmen, 2004).

بهینه‌سازی فرمول و اعتبارسنجی

پس از مدل‌سازی متغیرهای کیفی موردنظر، تعیین شرایط بهینه متغیرهای مستقل به‌منظور دستیابی به ماکزیمم مقدار اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت و اندیس اکسیداسیون و مینیمم مقدار الکل باقی مانده در محصول انجام گرفت. شرایط بهینه فرایند شامل ۱/۵ گرم مخمر، ۰/۷۵ گرم فسفات آمونیوم و ۰/۳۸ گرم سولفات پتاسیم در مرحله تولید تعیین گردید. به‌منظور اعتبارسنجی مدل‌های حاصل، نمونه بهینه تهیه و درصد خطای هر یک از پارامترهای کیفی مورد نظر با استفاده از رابطه ۴ محاسبه گردید. نتایج ویژگی‌های کیفی نمونه تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی و پیش‌بینی شده توسط مدل و درصد خطای برآورد هر ویژگی در جدول ۴ آورده شده است. تفاوت اندک میان نتایج ارزیابی شده و پیش‌بینی شده و همچنین درصد خطای محاسبه شده بیانگر صحت عملکرد مدل‌های حاصل است.

(۴) درصد خطا= (عدد پیش‌بینی شده- عدد واقعی)/ عدد واقعی

جدول ٤- بررسی صحت پیش‌بینی مدل‌های حاصل شده با استفاده از روش سطح پاسخ در پیش‌بینی فاکتورهای کیفی اسید استیک

Table 4- Prediction accuracy of the response surface models in predicting the quality characteristics of acetic acid

Percentage error درصد خطا	Predicted amount مقدار پیش‌بینی شده	Empirical value مقدار تجربی	Test آزمون
0.365	10.91	10.95	**Initial acidity** **اسیدیته اولیه**
0.267	11.22	11.25	**Final acidity** **اسیدیته نهایی**
10.00	0.11	0.10	**Activity** **فعالیت**
0.00	0.05	0.05	**Residual alcohol** **الکل باقی مانده**
7.13	2699.87	2529.00	**Oxidation index** **اندیس اکسیداسیون**

مقایسه ویژگی‌های کیفی نمونه بهینه و شاهد

در پژوهش حاضر، پارامترهای کیفی (اسیدیته اولیه و نهایی، فعالیت، الکل باقی مانده، اندیس اکسیداسیون) نمونه بهینه با دو نمونه شامل نمونه شاهد (صفر گرم مخمر، صفر گرم فسفات آمونیوم، صفر گرم سولفات پتاسیم)، و نمونه حاوی ترکیب فعال کننده‌ای تجاری به نام آستازوم که استفاده آن در صنعت رایج است مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت که نتایج آنها در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- مقایسه نمونه بهینه با نمونه شاهد و نمونه حاوی آستازوم

Table 5- Comparison in the optimal sample with the control and the sample containing Astasom

Oxidation index اندیس اکسیداسیون	Residual alcohol الکل باقی مانده	Activity فعالیت	Final acidity اسیدیته نهایی	Initial acidity اسیدیته اولیه	Samples نمونه‌ها
2520± 9[ab]	0.05± 0.002[b]	0.1± 0.03[ab]	11.25± 0.45[a]	10.95± 0.12[a]	Optimum بهینه
2630± 7[a]	0.02± 0.005[b]	0.15± 0.02[a]	11.28± 0.33[a]	10.82± 0.24[a]	Sample containing Astasom نمونه حاوی آستازوم
330± 5[c]	40± 0.23[a]	0± 0.00[c]	7.3± 0.59[b]	7.3± 0.67[b]	Control شاهد

جدول ٦- مقایسه ویژگی‌های کیفی نمونه بهینه و شاهد

Table 6- Comparison in the qualitative characteristics of the optimal and the control samples

Samples نمونه‌ها		Qualitative parameters پارامترهای کیفی
Control شاهد	Optimum بهینه	
0.185± 0.02[a]	0.10± 0.00[b]	Insoluble solids مواد جامد نامحلول (g/100ml)
4.50± 0.70[a]	5.00± 0.00[a]	Ascorbic acid اسید آسکوربیک (mg/100g)
1.95± 0.07[b]	6.05± 0.07[a]	Total phenol فنول کل (mg/L)
0.045± 0.007[a]	0.05± 0.00[a]	Rejuvenation sugar قند احیاء (g/100g)
8.87± 0.28[a]	6.25± 0.21[b]	Sulfur dioxide دی اکسید گوگرد (mg/kg)
0.0095± 0.001[a]	0.0095± 0.001[a]	Arsenic آرسنیک (mg/kg)
0.0095± 0.001[a]	0.0075± 0.004[b]	pb سرب (mg/kg)
0.87± 0.01[a]	0.45± 0.07[b]	Zn روی (mg/kg)
0.50± 0.00[a]	0.225± 0.04[b]	Cu مس (mg/kg)
1.16± 0.02[a]	1.095± 0.03[a]	Fe آهن (mg/kg)

در هر ردیف، میانگین‌های دارای حروف متفاوت، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار با هم دارند ($p<0.05$).

Averages with different letters in rows are different statistically ($p<0.05$)

همانطور که نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت و اندیس اکسیداسیون در نمونه بهینه به‌طور معنی‌داری بالاتر و میزان الکل باقی مانده کمتر از نمونه شاهد است ($p<۰/۰۵$). بنا بر نتایج حاصل و با توجه به حد قابل قبول تعیین شده برای

پارامترهای فوق الذکر که برای میزان الکل باقی مانده حداکثر ۰/۵٪ و برای اندیس اکسیداسیون ۳۰۰۰-۷۰۰ در نظر گرفته شده است (استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۴)، می‌توان گفت که نمونه شاهد نمونه مطلوب و مناسبی از نظر صنعت نیست و درواقع نیاز به فعال‌کننده برای انجام مطلوب فرایند ضرورت دارد. لذا، فعال کننده‌ای به نام آستازوم که ترکیبات تشکیل‌دهنده آن مشخص نشده است در حد توصیه شده در صنعت به نمونه شاهد (۱/۵ گرم به ازای ۳۰۰۰ میلی‌لیتر مش) اضافه گردید و ویژگی‌های کیفی محصول تولیدی با نمونه بهینه مورد مقایسه قرار گرفت. از آنجایی که نمونه بهینه از نظر پارامترهای کیفی صنعتی با نمونه حاوی آستازوم تفاوت چشمگیری را نشان نداد ($p>0/05$)، نمونه حاوی آستازوم جهت ارزیابی‌های کیفی بیشتر و مقایسه با نمونه بهینه مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج حاصل از بررسی برخی ویژگی‌های کیفی نمونه بهینه و شاهد (نمونه حاوی ترکیب فعال‌کننده آستازوم) نشان داد که نمونه بهینه و نمونه شاهد از نظر میزان اسید آسکوربیک و قند احیاء تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($p>0/05$). با توجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه محتوی فنول کل نمونه بهینه و شاهد می‌توان گفت که محتوی فنول کل نمونه بهینه به‌طور قابل توجهی بالاتر از نمونه شاهد است ($p<0/05$). این افزایش محتوی ترکیبات فنولیک در نمونه بهینه را می‌توان به استفاده از مواد مغذی و وجود منابع نیتروژن و پتاسیم که مکمل غذایی برای رشد و فعالیت بیشتر مخمر محسوب می‌شوند، و همچنین سنتز متابولیت‌های ثانویه توسط استوباکتر ناشی از حضور این مواد مغذی در محیط در حین فرایند تولید اسید استیک نسبت داد (Maris et al., 2006). کاهش میزان مواد جامد نامحلول در نمونه بهینه نسبت به نمونه شاهد به افزایش فعالیت مخمر و باکتری، مصرف بیشتر ترکیبات قندی توسط مخمر و تبدیل بیشتر اتانول به اسید استیک در نمونه بهینه مرتبط است (Plessi, 2003). بر طبق نتایج جدول ۶، نمونه بهینه از میزان دی‌اکسید گوگرد کمتری نسبت به نمونه شاهد برخوردار است ($p<0/05$)، همچنین میزان سرب، روی و مس در نمونه بهینه نسبت به نمونه شاهد کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد ($p<0/05$). این مشاهدات به فعالیت شلاته‌کنندگی فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در حضور کاتیون‌ها (Gorji et al., 2007) و وجود ناخالصی‌های موجود در آستازوم مربوط می‌شود.

نتیجه‌گیری

تولید اسید استیک در فرمانتور ناپیوسته تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند نوع و غلظت مخمر، pH، دما، غلظت اکسیژن و مواد مغذی محیط کشت قرار می‌گیرد. در این مطالعه اثر غلظت مخمر، غلظت فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم با هدف افزایش راندمان تولید اسید استیک توسط استوباکتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که فسفات آمونیوم به‌عنوان یک ماده مغذی مکمل باعث افزایش رشد مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* و باکتری استوباکتر و در نتیجه تولید بیشتر اسید استیک می‌گردد. استفاده از غلظت‌های بالاتر مخمر نیز تأثیر مطلوبی در افزایش راندمان تولید اسید استیک دارد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، افزایش غلظت مخمر و فسفات آمونیوم باعث افزایش اسیدیته، فعالیت و اندیس اکسیداسیون و کاهش میزان الکل باقی مانده می‌شود، درحالیکه سطوح بالای غلظت سولفات پتاسیم موجب کاهش اسیدیته، فعالیت و اندیس اکسیداسیون محصول می‌گردد. هرچند استفاده از سطوح متوسط آن در بهبود ویژگی‌های کیفی محصول مؤثر است. سطوح بهینه متغیرهای مستقل این پژوهش، استفاده از ۱/۵ گرم مخمر، ۰/۷۵ گرم فسفات آمونیوم و ۰/۳۸ گرم سولفات پتاسیم به دست می‌آید. نمونه بهینه تولیدی در مقایسه با نمونه شاهد دارای فعال کننده تجاری آستازوم داری مواد جامد نامحلول، دی‌اکسید گوگرد، سرب، روی و مس کمتر و محتوی فنول کل بالاتر است ($p<0/05$).

تشکر و قدردانی

از شرکت تاکستان زاینده رود (سرکه سارینا) به‌دلیل همکاری‌های اجرایی در راستای محقق شدن این تحقیق کمال تشکر را داریم.

منابع

1. AACC. (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 10th ed. Vol 2. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN; 2000: 02-31.01.
2. Abdolalizadeh, M. S., Vasheghani- Farahani, E., Khodabandeh, M., and Hashemi- Najafabadi, S. (2010). Optimization of Lactic Acid Production Conditions in Batch Fermentation of Whey by *Lactobacillus casei*. *Food Science and Technology (JFST)*, 7 (2), 96-102.
3. Adachi, O., and Yakushi, T. (2016). Membrane-bound dehydrogenases of acetic acid bacteria. In: Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., and Okamoto-Kainuma, A. editors. Acetic acid bacteria: Ecology and physiology. Tokyo: Springer Japan, pp. 273-97. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_13

4. Aguilar Uscanga, M. G., Escudero Abarca, B. I., Rodriguez, J. G., and Garcia, R. C. (2006). Carbon sources and their effect on growth, acetic acid and ethanol production by *brettanomyces bruxellensis* in batch culture. *Journal of food process Engineering*, 30 (1), 13-23. https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00097.x
5. Alben, E., and Erkmen, O. (2004). Production of Citric Acid from a New Substrate, Undersized Semolina, by *Aspergillus niger*. *Food Technol. Biotechnol*. 42 (1), 19–22.
6. AOAC. (2002), Official Methods ofAnalysis of AOAC International, 17th Edn., AOAC International, Maryland.
7. Ataye Salehi, E., Haddad Khodaparast, M. H., Lame, S. H., Habibi Najafi, M. B., and Fatemi, S. H. (2010). Utilization of Date Seed Powder as Supplementary Nutrient in the Alcoholic Fermentation of Cider Vinegar Production. *Food Technology and Nutrition*, 7 (3), 28-34.
8. Awad, H. M., Diaz, R., Malek, R. A., Othman, N. Z., Aziz, R. A., and EL Enshasy, H. A. (2012). Efficient Production Process for Food Grade Acetic Acid by *Acetobacter aceti* in Shake Flask and in Bioreactor Cultures. *E-Journal of Chemistry*, 9 (4), 2275-2286.
9. Balali-Mood, M., Riahi-Zanjani, B., Mahdizadeh, A., Moradi, V., and Fazeli-Bakhtiyari, R. (2018). Arsenic and Lead Contaminations in Commercial Fruit Juices of Markets in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Toxicology*, 12, 16-20.
10. Budak, N. H., Aykin, E., Seydim, A.C., Greene, A. K., and Seydim, Z. B. G. (2014). Functional properties of vinegar. *Journal of Food Science*, 79, 757–764.
11. Cevrimli, B. S., Kariptas, E., and Ciftci, H. (2009). Effects of Fermentation Conditions on Citric Acid Production from Beet Molasses by *Aspergillus niger*. *Asian Journal of Chemistry*, 21 (4), 3211-3218.
12. Dahdouh, L., Wisniewski, C., Ricci, J., Vachoud, L., Dornier, M., and Delalonde, M. (2016). Rheological study of orange juices for a better knowledge of their suspended solids interactions at low and high concentration. *Journal of Food Engineering*, 174, 15-20. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.11.008
13. Ding S., and Tan, T. (2006). L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41, 1451-1454. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.014
14. Gorji, M. A., Nahvi Emtiazi, G., and Bidram, H. 2007. The study of effective factors in improving the fermentation yield of wheat starch. *Pajouhesh and Sazandegi*, 74, 79- 89.
15. Hafzan, Y., Saw, J. W. and Fadzilah, I. (2017). Physicochemical properties, total phenolic content, and antioxidant capacity of homemade and commercial date (*Phoenix dactylifera* L.) vinegar. *International Food Research Journal*, 24 (6), 2557- 2562.
16. Haq, I., Ali, S., Qadeer, M., and Iqbal, J. (2002). Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based media. *Process Biochem*, 37, 1085-1090. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00322-3
17. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Liquid fruit and vegetable products determination of sulphur dioxide content. ISIRI no 4308. 1st ed.; 2017.
18. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Spice and condiment– Vinegar– Test methods. ISIRI no 1394. 1st ed.; 2003.
19. Joshi, V. K., Yadav, J., Sharma, R., Joshi, D., and Gupta, R. K. (2016). Effect of Nutrients and Growth Stimulators on Acetic Acid Fermentation using Natural Consortia. *International Journal of Food Fermentation Technology*, 6 (1), 81-95.
20. Maris, A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A. H., and Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 391–418. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9085-7
21. Mazaheri Asadi, M., and Nikkhah Maman, M. (2003). Investigation of citric acid production from date waste using *Aspergillus niger*. *Medical scholar*, 11 (47), 57-66.
22. Nadeem, A., Jafri, S. A., Baig, S., Irfan, M., and Syed, Q. (2017). Optimization of Substrate Concentration for Enhanced Citric Acid Production using *Aspergillus niger* M-101. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 52 (5), 275- 277.
23. Nascimento, R. A. d. A., Ferretti, L. P., and Gonçalves, A. R. (2005). Determination of Organic Acids and Ethanol in Commercial Vinegars. *Brazilian Journal* of *Food Technology*, 5, 51-6.
24. Ozturk, I., Caliskan, O., Tornuk, F., Ozcan, N., Yalcin, H., Baslar, M., and Sagdic, O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT– Food Science and Technology*, 63, 144–151. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.003
25. Plessi, M. (2003). Vinegar. In Encyclopedia of food Science and nutrition leds B Caballero, Trugo, L.C., and Finge, P. M. Oxford. Academic press. PP. 5996-6003.
26. Pooja, S., and Soumitra, B. (2013). Optimization of process parameters for vinegar production using banana fermentation. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2, 501–514.

27. Rao, P. R., and Reddy, M. K. (2013). Production of Citric Acid by *Aspergillus Niger* Using Oat Bran as Substrate. *International Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 3 (3), 181-190.
28. Rashidi, H., and Mazaheri Asadi, M. (2008). Optimization of conditions for citric acid production from date waste using liquid phase method. *Microbiological knowledge*, 1 (1), 1-11.
29. Robert, W. H. (2006). Microbiology and technology of fermented foods. Blackwell publishing. pp. 397-417.
30. Rosada, K. K. (2018). Enhanced acetic acid production from manalagi apple (*Malus sylvestris* mill) by mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti* in submerged fermentation. *Journal of Physics: Conference Series*, 1013, 1-7.
31. Sarkar, D., and Das, K. (2017). Optimization of citric acid production from *aspergillus niger* using pineapple waste as feedstock in submerged fermentation. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6 (17), 810-818.
32. Sharifi, M., Saeedi Asl, M. R., Haddad Khodaparast, M. H., Jahed, E., Abedinia, A. R., and Sardarian, A. (2015). The investigation of stimulating effects of Kbkab and Mrdasng palm seed powder on Saccharomyces cerevisiae in the apple cider vinegar production. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 6 (22), 10-18.
33. Zhang, H., Li, J., Zhang, Q., Zhu, S., Yang, S., and Zhang, Z. (2020). Effect of Substrate Concentration on Photo-Fermentation Bio-Hydrogen Production Process from Starch-Rich Agricultural Leftovers under Oscillation. *Sustainability*, 12, 1-8.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 415- 426

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۲۶-۴۱۵

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

CC BY

Full Research Paper

Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of *Trigonella foenum* aqueous extract "*in vitro*"

Hediyeh Yousefipour[1], Mohammad Amin Mehrnia[*2], Behrooz Alizadeh Behbahani[2], Hossein Jooyandeh[3], Mohammad Hojjati[3]

Received: 2021.09.05
Revised: 2021.10.30
Accepted: 2021.11.13
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Yousefipour, H., Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Hojjati, M. (2022). Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of *Trigonella foenum* aqueous extract "*in vitro*". *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 415-426.

Abstract

Introduction: Herbs and spices, which are essential part of the human diet, have been used in traditional medicine to increase the flavor, color, and aroma of various foods and food products. Herbs and spices are also known as preservative, antioxidative, and antimicrobial agents. Plant extracts and their components with pathogen-growth suppression effect and little toxicity to host cells could be considered as excellent candidates for developing new antimicrobial agents. *Trigonella foenum*- graceum is an annual herbaceous plant with bright yellow and sometimes purple-white flowers. Therapeutic effects of this plant include analgesia, anti-cancer, and treatment of diabetes by lowering blood sugar and lowering blood lipids. In ancient Egypt, this plant was used to embalm the dead and incense. The seeds of the plant are used to treat leprosy, hemorrhoids, and relieve bronchitis. The seeds of this plant contain various compounds such as vitamins, amino acids, saponins, fatty acids, and flavonoids. The antimicrobial and antioxidant effects of *T. foenum* have been detrmined byvarious studies. This study was therefore aimed to produce the *T. foenum* extract and evaluate its antioxidant and antimicrobial properties.

Materials and methods: Fifty g of powdered plant was added to 250 mL of water and stirred for 72 h. The solution was passed through the Whatman filter paper and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min to discard the suspended solids. Next, a vacuum evaporator was used to remove the excess water and the obtained extract was packed and kept away from light at 4 °C. Total phenol and flavonoid contents were measured by colorimetric methods. The antimicrobial effect of the extract on *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Candida albicans* was evaluated using disc diffusion agar (DDA), well diffusion agar (WDA), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal /fungicidal concentration (MBC/MFC) methods. Interaction of aqueous extract and Chloramphenicol and Amphotericin B was also evaluated. Antioxidant effect of the extract was determined by ABTS, DPPH, and β-carotene/linoleic acid bleaching assay. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was also used to identify the functional groups.

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. 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.
3. 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: Mehrnia@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72348.1092

Results and discussion: Total phenol and flavonoid contents of the extract were 46.60 mg GAE/g and 37.57 mg QE/g, respectively. The aqueous extract also showed antioxidant effects of 60.55, 55.53 and 50.40%, based on DPPH, ABTS methods and β-carotene/linoleic acid assay, respectively. *T. foenum* aqueous extract had the inhibitory effect on all examined microorganisms, at all concentrations (20, 40, 60 and 80 mg/mL). The antibiotic effect of chloramphenicol for *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* and *B. cereus* was 13.30, 14.50, 18 and 19.10 mm, respectively, and the effect of this antibiotic for *C. albicans* was not measured. Also, the antibiotic effect of amphotericin B for *C. albicans* was 15.10 mm. Furthermore, the interaction of *T. foenum* aqueous extract with the antibiotic chloramphenicol presented a synergistic effect on the examined bacteria and led to a significant increase in inhibition zone diameter. Additionally, the interaction of the extract with antibiotics showed a synergistic effect on *C. albicans*. In infrared spectrum, peaks at 3370, 2965, and 1613 cm^{-1} were related to stretching vibration of O-H, C-H, C=C bonds of aromatic ring and aromatic groups of *T. foenum* aqueous extract. In general, the extract of *T. foenum* could be used as a natural antioxidant and antimicrobial agent in food and pharmaceutical industries.

Keywords: Aqueous extract of *Trigonella foenum*, Antimicrobial properties, Antioxidant properties, Total phenol and flavonoids.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 415- 426

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۲۶-۴۱۵

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی گروه‌های عاملی ترکیبات زیست‌فعال، توانایی رادیکال گیرندگی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی شنبلیله (*Trigonella foenum*) در شرایط برون‌تنی

هدیه یوسفی‌پور[۱]- محمدامین مهرنیا[۲]*- بهروز علیزاده بهبهانی[۲]- حسین جوینده[۳]- محمد حجتی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

چکیده

امروزه به دلیل اثرات سمی آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی سنتزی تمایل به استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌ها افزایش یافته است. از این‌رو در این پژوهش میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره آبی گیاه شنبلیله، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B بررسی شد. همچنین گروه‌های عاملی عصاره آبی توسط طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه مورد مطالعه قرار گرفت. میزان فنول کل عصاره برابر با ۶۴/۶۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و میزان فلاونوئید کل برابر با ۳۷/۵۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره بود. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در ۳ روش مهار رادیکال آزاد ۱ و ۱- دیفنیل- ۲-پیکریل- هیدرازیل، روش مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲-آزینوبیس (۳- اتیل بنزوتیازولین ۶- سلفونیک اسید) و روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید به‌ترتیب برابر با ۶۰/۵۵، ۵۵/۵۳ و ۵۰/۴۰ درصد بود. همچنین مشخص گردید که عصاره آبی گیاه شنبلیله دارای خاصیت ضدمیکروبی خوبی بوده و برهمکنش عصاره با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B اثر سینرژیستی را در برابر میکروارگانیسم‌های *Escherichia coli*، *Enterobacter aerogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و *Candida albicans* نشان داد. ازاین‌رو، عصاره آبی گیاه شنبلیله می تواند یک جایگزین مناسبی برای ترکیبات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی سنتزی به شمار رود.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی شنبلیله، فعالیت ضدمیکروبی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فنول و فلاونوئید کل.

مقدمه

بیماری‌های عفونی یکی از مهمترین مشکلات جهان به‌شمار می روند که سالیانه منجر به مرگ بیش از ۵۷ میلیون انسان در جهان می‌شود. در سه دهه اخیر، تعدادی آنتی‌بیوتیک جدید در صنعت داروسازی تولید شده که اثرات سمی و مقاومت میکروبی منجر به کاهش اثر بخشی این داروها شده است. از سوی دیگر، گونه‌های فعال اکسیژن که از متابولیسم سلولی تولید می‌شوند بسیار سمی بوده و در نتیجه آسیب به لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها در ایجاد بیماری های مزمن نقش دارند. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی در جلوگیری از این امر مؤثر می باشد، اما به دلیل اثرات سمی و سرطان‌زایی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی این ترکیبات با انواع طبیعی جایگزین شده‌اند (Akhtar et al., 2018). ادویه‌ها و گیاهان معطر که از مهمترین اجزای رژیم غذایی انسان می‌باشند، از زمان‌های گذشته به‌عنوان داروهای سنتی و ایجاد عطر و طعم و رنگ در مواد غذایی استفاده می‌شوند. علاوه بر عطر و طعم بالا، گیاهان معطر و ادویه‌ها به دلیل خاصیت نگهدارندگی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نیز شناخته شده می‌باشند (Babuskin et al., 2014). عصاره‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها به‌دلیل فعالیت بیولوژیکی متعدد، جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها و اثرات سمی بسیار اندکی که روی سلول‌های میزبان دارند، گزینه‌های مناسبی جهت گسترش داروهای ضدمیکروبی می‌باشند. این مواد در بخش‌های مختلف گیاه

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- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۴- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: Mehrnia@asnrukh.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72348.1092

مانند دانه، میوه، گل، برگ، ساقه و ریشه یافت می‌شوند و از جمله ترکیبات دارویی آن‌ها می‌توان به آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها و فنول‌ها اشاره کرد (Jaberian et al., 2013). در مطالعات گوناگون اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده است (Alizadeh Behbahani et al., 2012؛ Yeganegi et al., 2018؛ Chen et al., 2008؛ Kukić et al., 2008).

نام گیاه شنبلیله یا شنبلید (*Trigonella foenum*- graceum) از کلمه یونانی Trigonella به دلیل سه گوشه بودن شکل برگچه‌ها و foenum- graceum به معنای علف یونانی (Greek hay) به دلیل کاربردهای آن در دوره یونان باستان گرفته شده است. شنبلیله یک گیاه علفی، یک ساله با گل‌هایی به رنگ زرد روشن و گاهی بنفش مایل به سفید بوده که طول آن تا ۵۰ سانتی‌متر می‌رسد. این گیاه در مناطق مختلف از جمله مصر، چین، مراکش، هند، اسپانیا و ایتالیا کشت می‌شود. بیش از ۱۰۰ نوع گونه زراعی و وحشی این گیاه در دنیا شناخته شده است که گزارش شده است بیش از ۳۲ گونه آن در بخش‌های مختلف ایران مانند خراسان، آذربایجان، دامغان، مناطق مرکزی، فارس و اصفهان پراکنده می‌باشد (Hasanzadeh et al., 2010). از اثرات درمانی این گیاه می‌توان به ضددرد، ضدسرطان، درمان دیابت و کاهش قند خون و کاهش چربی خون اشاره کرد. در مصر قدیم از این گیاه برای مومیایی کردن مردگان و بخور استفاده می‌شده است. از دانه‌های گیاه جهت معالجه جذام، معالجه بواسیر، رفع التهاب نایژه‌ها و برطرف کردن بوی بد دهان استفاده می‌شود (Modaresi and Mahdian, 2012). دانه‌های این گیاه حاوی ترکیبات مختلفی مانند ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، ساپونین‌ها، اسیدهای چرب و فلاونوئیدها می‌باشد (Arbab et al., 2020). در پژوهش‌های مختلف اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی گیاه شنبلیله مطالعه شده است. Wagh و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف اسانس گیاه شنبلیله بر روی میکروارگانیسم‌های *Aspergillus niger*، *Aspergillus fumigatus*، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* را بررسی کردند (Wagh et al., 2007). Akbari و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که روغن دانه شنبلیله دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد و می‌تواند در داروسازی مورد استفاده قرار گیرد (Akbari et al., 2019). با توجه به خواص درمانی و ویژگی‌های بیولوژیکی گیاه شنبلیله، هدف از این پژوهش بررسی میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره این گیاه و مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن بر *Escherichia coli*، *Enterobacter aerogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و *Candida albicans* و بررسی گروه‌های عاملی موجود در آن بود.

مواد و روش‌ها

محلول تری‌فنل‌ترازولیوم کلراید، دیسک‌های بلانک، آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B، محیط‌های سابروز دکستروز آگار، سابروز دکستروز براث، مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث از شرکت مرک (آلمان) و بتاکاروتن، لینولئیک اسید، ABTS[1]، DPPH[2] و معرف فولین- سیوکالچو از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شدند. در این پژوهش از سویه‌های *Escherichia coli*، *Enterobacter aerogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و *Candida albicans* نگهداری شده در کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده شد.

تهیه عصاره آبی گیاه شنبلیله

پس از خشک کردن و پودر کردن گیاه، از روش خیساندن جهت تهیه عصاره آبی آن استفاده شد. طبق این روش، ۵۰ گرم از گیاه پودر شده به ۲۵۰ میلی‌لیتر آب اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور مجهز به سیستم لرزان هم زده شد. پس از عبور محلول از کاغذ صافی واتمن جهت حذف ترکیبات معلق موجود به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد با استفاده از اواپراتور تحت خلأ آب اضافی حذف و عصاره به‌دست آمده دور از نور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد (Tabatabai Yazdi et al., 2016).

اندازه‌گیری میزان فنول کل

از معرف فولین- سیوکالچو جهت اندازه‌گیری فنول کل عصاره آبی شنبلیله استفاده شد. بدین ترتیب که، ۱ میکرولیتر عصاره به ۲/۵ میلی لیتر محلول فنول اضافه شد. نمونه به مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات (۷ درصد) به آن اضافه و پس از گذشت ۶۰ دقیقه، جذب آن در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. از گالیک اسید جهت تهیه نمودار استاندار استفاده شد. مقدار فنول کل بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره (mg GAE/g) گزارش گردید (Majdi et al., 2021).

1 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

2 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

به‌منظور تعیین فلاونوئید کل عصاره آبی گیاه شنبلیله، ۰/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر عصاره یا ۰/۵- صفر میلی‌گرم در میلی‌لیتر کوئرستین با ۰/۳ میلی‌لیتر محلول نیتریت سدیم (۵ درصد) مخلوط شد. در مرحله بعد محلول به مدت ۵ دقیقه همزده شد. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر آلومینیوم تری کلراید ۱۰ درصد وزنی/ حجمی به آن اضافه و مجدداً ۶ دقیقه همزده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر سود ۱ مولار به آن‌ها اضافه گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان فلاونوئید کل بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره (mg QE/g) گزارش گردید (Barzegar et al., 2020).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد ABTS و روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شنبلیله استفاده شد.

اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

در این روش ۳/۹ میلی‌لیتر محلول استوک DPPH (۰/۰۰۴ گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول) به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره اضافه و به خوبی مخلوط گردید. پس از نگهداری محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب آن در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Behbahani et al., 2018):

$$\% \text{ Scavenging activity} = [(Abs_{control} - Abs_{sample})]/(Abs_{control}] \times 100 \quad (۱)$$

$Abs_{control}$؛ جذب DPPH به همراه متانول و Abs_{sample}؛ جذب رادیکال DPPH به همراه نمونه.

روش مهار رادیکال آزاد ABTS

ابتدا محلول ABTS و پتاسیم پرسولفات به‌منظور تولید رادیکال های آزاد ABTS با یکدیگر مخلوط شدند. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره به محلول رادیکالی ABTS (۳/۹ میلی‌لیتر) اضافه و جذب نمونه در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS عصاره طبق فرمول زیر محاسبه شد (Alizadeh Behbahani et al., 2021):

$$\text{ABTS} - \text{RS activity } (\%) = \frac{\text{A control} - \text{A sample}}{\text{A control}} \quad (۲)$$

روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید

روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید بر اساس جلوگیری از اکسیداسیون لینولئیک اسید و تغییر رنگ بتاکاروتن از طریق رادیکال های آزاد می‌باشد که هیدروپراکسیدهای کنژوگه و ترکیبات فرار را تولید می‌کنند. رنگ‌بری بتاکاروتن با استفاده از رادیکال‌های آزاد می‌باشد که توانایی تولید ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کنژوگه را دارا هستند. به‌طور خلاصه درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Behbahani et al., 2019):

$$\text{Inhibitory percentage } (\%) = [(A_{A120} - A_{C120}) / (A_{C0} - A_{C120})] \times 100 \quad (۳)$$

که A_{A120} جذب عصاره بعد از ۱۲۰ دقیقه، و A_{C120} و A_{C0} به ترتیب جذب نمونه کنترل در زمان صفر و بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی عصاره

روش‌های نفوذ در دیسک آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی جهت بررسی قدرت ضدمیکروبی شنبلیله مورد استفاده قرار گرفت.

نفوذ در دیسک آگار

غلظت‌های مختلف عصاره (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) تهیه و توسط فیلترهای ۴۵ میکرومتر استریل گردید. سپس دیسک‌های بلانک به مدت ۱۵ دقیقه در غلظت‌های مختلف عصاره نگهداری شدند. سپس دیسک روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری‌ها و سابروز دکستروز حاوی قارچ تثبیت شدند. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌ها و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد (Barzegar et al., 2020).

چاهک آگار

پس از کشت سطحی باکتری‌ها و قارچ روی محیط‌های مولر هینتون آگار و سابروز دکستروز آگار و ایجاد چاهک‌ها در هر پلیت، غلظت‌های مختلف عصاره در هر چاهک ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌ها و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گرد برای قارچ گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Behbahani et al., 2018).

حداقل غلظت مهارکنندگی

عصاره با ۰/۵ میلی‌لیتر DMSO[1] مخلوط و محلول به ۹/۵ میلی لیتر مولر هینتون براث برای باکتری‌ها و سابروز دکستروز برای قارچ اضافه شد. سپس رقت‌های متوالی (۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از محلول با افزودن ۵ میلی‌لیتر غلظت قبلی به مقدار مساوی از هر یک از محیط‌های کشت تهیه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به همراه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی و قارچ به همراه کنترل مثبت و منفی به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌ها و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ، معرف تری فنل تترازولیوم کلراید (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه و مجدداً به مدت ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد. کمترین غلظتی از عصاره که رشد میکروبی جلوگیری کرده و هیچگونه تغییر رنگی در آن غلظت مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (Yeganegi et al., 2018).

حداقل غلظت کشندگی

در این روش که در ادامه روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی انجام می‌شود، از چاهک‌های فاقد رنگ قرمز تیره یا ارغوانی در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابروز دکستروز برای قارچ کشت داده شد. پلیت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های حاوی قارچ به مدت ۷۲ پلیت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. اولین غلظت فاقد هیچگونه رشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (Barzegar et al., 2019).

ارزیابی برهمکنش (هم‌افزایی و کاهندگی) عصاره در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B

از روش انتشار دیسک به‌منظور ارزیابی برهمکنش عصاره آبی شنبلیله با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه استفاده شد. جهت ارزیابی اثر هم‌افزایی و کاهندگی عصاره بر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B از غلظت تحت مهاری (sub-MIC) که معمولاً ۱/۲ و ۱/۴ حداقل غلظت مهارکنندگی بوده استفاده می‌شود. غلظت تحت مهاری (حداقل غلظت مهارکنندگی) عصاره به محیط‌های مولر هینتون آگار و سابروز دکستروز آگار اضافه و باکتری‌ها و قارچ روی محیط‌های مربوطه به صورت چمنی با استفاده از سوآپ کشت داده شدند. در مرحله بعد دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی محیط آگار قرار داده شدند و گرمخانه‌گذاری پلیت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های حاوی قارچ به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در انتها، قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Barzegar et al., 2020).

طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)

جهت شناسایی کیفی و تعیین گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی عصاره از آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه استفاده شد. ابتدا پودر عصاره با پتاسیم برمید مخلوط و سپس فشرده شد. طیف FTIR عصاره توسط دستگاه FTIR در طول‌موج cm^{-1} ۵۰۰۰-۴۰۰۰ ثبت گردید (Sosani Gharibvand et al., 2020).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

هر یک از آزمون‌های این پژوهش در ۳ تکرار انجام و نتایج به صورت "انحراف معیار ±میانگین" گزارش و نتایج به‌دست آمده با کمک نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0/05$) انجام شد.

نتایج و بحث

ترکیبات فنولی مختلفی در گیاهان وجود دارد و فلاونوئیدها از جمله مشتقات این ترکیبات می‌باشند که در بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارند. گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار ترکیبات فنولی به‌عنوان دهنده هیدروژن موجب کنترل عوامل اکسید کننده و ازاین‌رو جلوگیری از اکسیداسیون می‌شوند (Mehrnia et al., 2021). همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، میزان فنول کل عصاره آبی شنبلیله برابر با ۶۴/۶۰ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره و میزان فلاونوئید کل آن برابر با ۳۷/۵۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره می‌باشد. نتایج هر یک از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شده برای عصاره آبی شنبلیله در جدول ۱ گزارش شده است که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای این عصاره می‌باشد. Norziah و همکاران (۲۰۱۵) میزان فنول کل عصاره‌های تهیه شده از آب و آب داغ دانه شنبلیله را به‌ترتیب ۱۹/۳۱ و ۲۵/۶۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره، میزان فلاونوئید کل این عصاره‌ها را به‌ترتیب ۳/۷۶ و ۷/۳۰ میلی‌گرم کاتچین در گرم عصاره گزارش کردند. این پژوهشگران فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای این عصاره‌ها را به ترکیبات فنولی موجود در آن‌ها نسبت دادند (Norziah

1 Dimethyl sulfoxide

et al., 2015). در مطالعه دیگری میزان فنول کل عصاره اتانولی برگ تازه، برگ بالغ و دانه شنبلیله به‌ترتیب ۵۴/۷۹، ۴۱/۲۸ و ۲۳/۸۵ گرم گالیک اسید در کیلوگرم وزن خشک گزارش شده است. همچنین وجود ترکیبات فنولی به بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی در هر یک از عصاره‌ها نسبت داده شده است (Singh et al., 2014). جهت درک مکانیسم دارویی گیاه شنبلیله خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی آن مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد مانند آسکوربیک اسید، BHT[1]، آلفا توکوفرول، زردچوبه، کوئرستین و ترولوکس با استفاده از روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. عصاره در تمامی روش‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان داد. در این پژوهش میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره به ترتیب ۴۰ میلی‌گرم پیروکاتکول در گرم عصاره و ۸۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شده است (Subhashini et al., 2011). تفاوت در میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به عوامل مختلفی مانند روش‌های استخراج، اختلاف سن گونه، شرایط آب و هوایی، نوع خاک، زمان جمع‌آوری گیاه و محل رشد آن وابسته می‌باشد (Ansari pour et al., 2019).

جدول ۱- میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شنبلیله

Table 1- Total phenol, flavonoid and antioxidant activity of aqueous extract of Trigonella foenum

Antioxidant activity (%)				
β-carotene/linoleic acid bleaching	ABTS	DPPH	Total flavonoid (mg QE/g)	Total phenol(mg GAE/G)
50.40± 0.64	55.53± 0.50	60.55± 0.78	37.57± 0.39	64.60± 0.51

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن آگار) عصاره آبی شنبلیله بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برحسب میلی‌متر

Table 2- Mean inhibition zone (mm) of aqueous extract of Trigonella foenum on pathogenic bacteria (disk diffusion agar)

Concentration (mg/ml)				
80	60	40	20	Microorganism
13.40± 0.28[d]	10.80± 0.32[c]	8.90± 0.25[b]	7.10± 0.18[a]	***E. coli***
12.50± 0.35[c]	10.00± 0.30[b]	8.00± 0.65[a]	7.00± 0.40[a]	***E. aerogenes***
16.30± 0.42[d]	13.50± 0.23[c]	10.80± 0.29[b]	8.40± 0.28[a]	***S. aureus***
15.00± 0.37[d]	11.80± 0.20[c]	9.90± 4.40[b]	7.60± 0.38[a]	***B. cereus***
15.50± 0.44[d]	13.30± 0.29[c]	10.60± 0.36[b]	8.50± 0.15[a]	***C. albicans***

نتایج به‌صورت "انحراف معیار± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده‌اند.

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شنبلیله است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.

Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

میانگین قطر هاله عدم رشد در روش دیسک دیفیوژن در جدول ۲ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که برای هر یک از میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه با افزایش غلظت عصاره آبی خاصیت ضد میکروبی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، درحالی‌که غلظت‌های یکسان در میکروارگانیسم‌های مختلف فاقد اثر معنی‌داری می‌باشند. در این روش کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *E. aerogenes* مشاهده شد که بیانگر مقاومت بالای این باکتری به عصاره آبی شنبلیله و تأثیر کم عصاره بر این باکتری می‌باشد و بیشترین قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در باکتری *S. aureus* نشان از حساسیت این باکتری به عصاره آبی شنبلیله می‌باشد. میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار (جدول ۳) نشان می‌دهد که افزایش غلظت عصاره آبی در تمامی میکروارگانسیم‌ها منجر به افزایش قطر هاله عدم رشد می‌شود که این افزایش در تمامی میکروارگانیسم‌ها به جز باکتری *E. aerogenes* معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). در باکتری *E. aerogenes* در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید در حالی‌که در سایر غلظت‌ها میزان قطر هاله‌های عدم رشد دارای اختلاف معنی‌داری بودند. همچنین غلظت های یکسان به‌جز غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاقد اثر معنی‌داری در میکروارگانیسم‌های مختلف بود. در این غلظت‌ها (۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قطر هاله عدم رشد باکتری *E. aerogenes* اختلاف معنی‌داری را با سایر میکروارگانیسم‌ها نشان داد. به‌طور کلی در این روش نیز کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری

1Butylated hydroxyl toluene

E. aerogenes و بیشترین مقدار آن در باکتری *S. aureus* مشاهده گردید. مقایسه نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار نشان می‌دهد که اثر ضدمیکروبی عصاره آبی شنبلیله در روش چاهک آگار بیشتر بوده که این امر به دلیل تماس مستقیم عصاره با میکروارگانیسم ها در روش چاهک آگار می‌باشد. درحالی‌که در روش دیسک دیفیوژن عصاره پس از انتشار دیسک اثر خود را نشان می‌دهد (Alizadeh Behbahani et al., 2021).

جدول۳- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (چاهک آگار) عصاره آبی شنبلیله بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برحسب میلی‌متر

Table 3- Mean inhibition zone (mm) of aqueous extract of *Trigonella foenum* on pathogenic bacteria (well diffusion agar)

Concentration (mg/ml)				
80	60	40	20	Microorganism
14.50± 0.34[d]	12.00± 0.15[c]	9.90± 0.28[b]	7.60± 0.24[a]	***E. coli***
13.20± 0.41[c]	10.10± 0.48[b]	9.50± 0.33[b]	7.50± 0.28[a]	***E. aerogenes***
17.50± 0.38[d]	14.60± 0.46[c]	12.00± 0.54[b]	9.60± 0.31[a]	***S. aureus***
16.20± 0.27[d]	13.50± 0.43[c]	10.80± 0.39[b]	8.00± 0.47[a]	***B. cereus***
17.00± 0.56[d]	14.20± 0.31[c]	11.00± 0.44[b]	8.60± 0.50[a]	***C. albicans***

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده‌اند .

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شنبلیله است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.

Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

جدول ٤- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی شنبلیله بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

Table 4- Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of aqueous extract of *Trigonella foenum* on pathogenic microorganisms

MBC/MFC[۲] (mg/ml)	MIC[۱] (mg/ml)	Microorganism
512	32	***E. coli***
>512	64	***E. aerogenes***
256	8	***S. aureus***
256	8	***B. cereus***
256	8	***C. albicans***

در جدول ۴ حداقل غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی عصاره آبی شنبلیله را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج، کمترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی مربوط به *S.aureus*، *Bacillus cereus* و *C. albicans* و بیشترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی مربوط به *E. aerogenes* می‌باشد.

نتایج حاصل از اثر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B و برهمکنش آن‌ها با عصاره آبی شنبلیله در جدول ۵ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که اثر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری های *E. coli*، *E. aerogenes*، *S. aureus* و *B. cereus* به‌ترتیب ۱۳/۳۰، ۱۴/۵۰، ۱۸ و ۱۹/۱۰ میلی‌متر بوده و اثر این آنتی‌بیوتیک برای سویه قارچی *C. albicans* انجام نشد. همچنین اثر آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B برای *C. albicans* برابر با ۱۵/۱۰ میلی‌متر می‌باشد. در حالی‌که اثر این آنتی‌بیوتیک برای باکتری‌های مورد مطالعه انجام نشد. همچنین مشخص می‌شود که برهمکنش عصاره آبی با آنتی-بیوتیک کلرامفنیکل دارای اثر سینرژیستی برای باکتری‌ها بوده و سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد در همه باکتری‌ها می‌شود. در رابطه با قارچ *C. albicans* برهمکنش عصاره با آنتی‌بیوتیک دارای اثر سینرژیستی بوده منجر می‌شود که قطر هاله عدم رشد به ۲۰/۲۰ میلی-متر به‌طور معنی‌داری افزایش یابد.

اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی با استفاده از روش‌های مختلف در مطالعات گوناگون بررسی شده است (Alizadeh Behbahani et al., 2012؛ Yazdi et al 2013؛ Behbahani et al., 2012). در رابطه با خاصیت ضدمیکروبی بخش‌های مختلف گیاه شنبلیله نیز مطالعاتی صورت گرفته است. به‌عنوان مثال در بررسی اثر عصاره‌های اتانولی و آبی دانه شنبلیله بر میزان رشد *S. aureus* تلقیح شده در فیله کپور مشخص گردید که تعداد این باکتری‌ها با گذشت زمان در نمونه‌های شاهد افزایش و در نمونه‌های حاوی عصاره کاهش

1 Minimum inhibitory concentration

2 Minimum bactericidal/fungicidal concentration

می‌یابد و غلظت ۴ درصد عصاره‌های اتانولی و آبی منجر به توقف رشد باکتری در روزهای ۹ و ۱۲ دوره نگهداری شد (Arbab et al., 2020). اثر ضدمیکروبی روغن دانه این گیاه بر روی *S. aureus*، *Salmonella typhimurium*، *E. coli* و *A. niger* نشان داد که روغن این گیاه دارای خاصیت ضدمیکروبی قابل توجهی در برابر تمامی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه می‌باشد و بیشترین خاصیت ضدمیکروبی در *E. coli* و *A. niger* مشاهده شد (Sulieman et al., 2018). همچنین گزارش شده است که عصاره‌های آبی، استونی و متانولی تهیه شده از برگ، دانه و ساقه گیاه شنبلیله دارای خاصیت ضدمیکروبی در برابر باکتری‌های *E. coli* و *Staphylococcus* می‌باشد و در بین عصاره‌های مختلف بیشترین خاصیت در عصاره متانولی مشاهده شد (Sharma et al., 2016). اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ‌های تازه و رسیده و دانه گیاه شنبلیله با روش دیسک دیفیوژن بررسی و گزارش گردید که برگ‌های رسیده در مقایسه با نوع دیگر دارای خاصیت ضدمیکروبی بیشتری در برابر باکتری *B. cereus* می‌باشد (Singh et al., 2014). Haque و همکاران (۲۰۱۵) خاصیت ضدمیکروبی اسانس دانه شنبلیله در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند. مطالعات نشان می‌دهد که خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به دلیل وجود ترکیبات زیست فعالی است که به سطح سلول متصل شده و سپس به لایه‌های فسفولیپیدی غشای سلولی وارد می‌شود (Haque et al., 2015). این امر منجر به اختلال در یکپارچگی ساختار غشا و در نهایت مرگ سلول می‌شود. از سوی دیگر حساسیت باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه به باکتری‌های گرم منفی به عصاره آبی گیاه شنبلیله می‌تواند به دلیل تفاوت در ساختار غشایی این باکتری‌ها باشد. به‌گونه‌ای که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی بسیار مستحکم، پیچیده و حاوی مقادیر زیادی لیپوپلی‌ساکارید بوده که منجر به عبور مقادیر محدودی از ترکیبات می‌شود. درحالی‌که باکتری‌های گرم مثبت فاقد غشای پیچیده می‌باشند و توسط دیواره پپتیدوگلیکان غیر متراکم احاطه شدند در نتیجه ترکیبات ضدمیکروبی به‌راحتی به غشا سلولی دسترسی خواهند داشت (Shahidi et al., 2019).

جدول ۵- اثر ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B و برهمکنش آن‌ها با عصاره آبی شنبلیله

Table 5- Antimicrobial effect of chloramphenicol and amphotericin B and their interaction with aqueous extract of *Trigonella foenum*

Antimicrobial agent				Microorganism
Amphotericin B+ Extract	Chloramphenicol+ Extract	Amphotericin B	Chloramphenicol	
Not done	19.220± 0.55[b]	Not done	13.30± 0.50[a]	***E. coli***
Not done	19.00± 0.47[b]	Not done	14.50± 0.44[a]	***E. aerogenes***
Not done	25.60± 0.62[b]	Not done	18.00± 0.34[a]	***S. aureus***
Not done	20.90± 0.46[b]	Not done	19.10± 0.30[a]	***B. cereus***
20.20± 0.41[b]	Not done	15.10± 0.43[a]	Not done	***C. albicans***

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده‌اند.

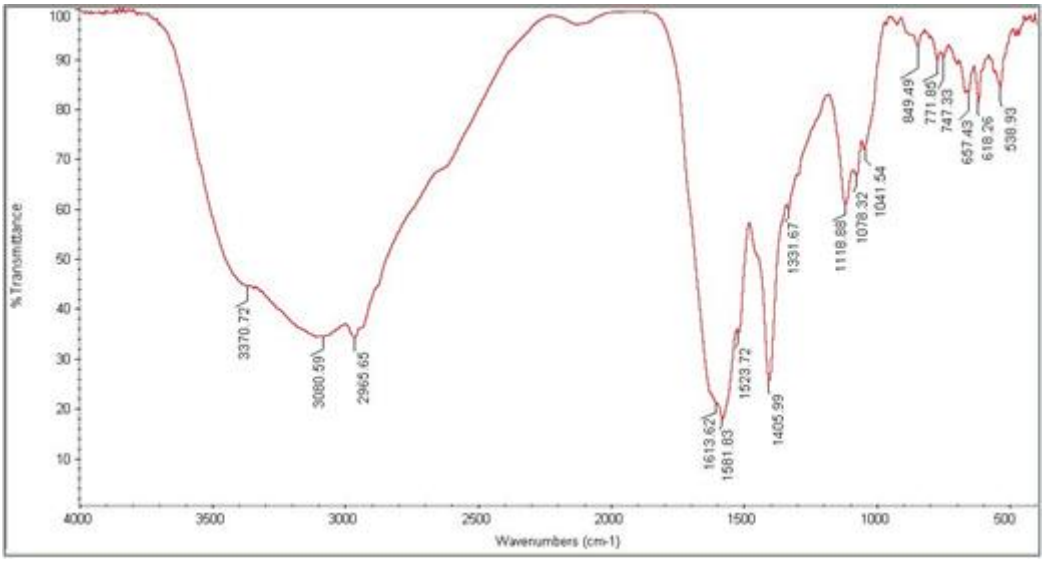
حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شنبلیله است (P<۰/۰۵).

Values are expressed as mean ±standard deviations, n =3.

Different small letters in each row show a significant difference at P< 0.05 between different treatments.

عصاره‌های گیاهی از سیستم‌های پیچیده‌ای تشکیل شده‌اند. طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه جهت شناسایی گروه‌های عاملی موجود در عصاره آبی شنبلیله استفاده شد (شکل ۱). در این شکل پیک پهن به مرکزیت ۳۳۷۰ cm^{-1} به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل و عدد موجی ۲۹۶۵ cm^{-1} به دلیل پیوندهای C-H می‌باشد (Sosani Gharibvand et al., 2020؛ Alizadeh Behbahani et al., 2020). همچنین عدد موجی ۱۶۱۳ cm^{-1} می‌تواند به دلیل گروه های C=C در حلقه‌های آروماتیک، عدد موجی ۱۵۰۷ cm^{-1} به دلیل ارتعاش در آمین‌ها و عدد موجی ۱۴۰۵ cm^{-1} به دلیل ژمینال متیل[1] باشد (Vidhu et al., 2014). علاوه بر این عدد موجی ۱۴۰۵ cm^{-1} و ۱۳۳۱ cm^{-1} به دلیل پیوند خمشی C-H نشان‌دهنده آلکان، عدد موجی ۱۱۱۸ cm^{-1} و ۱۰۷۸ cm^{-1} به دلیل پیوند کششی C-O نشان‌دهنده الکل نوع دوم، عدد موجی ۱۰۴۱ cm^{-1} به دلیل پیوند کششی S=O نشان‌دهنده سولفوکسید، عدد موجی ۸۴۹ cm^{-1} به دلیل پیوند خمشی C-H نشان‌دهنده استخلاف ۱و ۲و ۳ و عدد موجی ۷۴۷ cm^{-1} به دلیل پیوند خمشی C=C نشان‌دهنده الکل می‌باشد (Namazi et al., 2021).

1 Geminal methyl



شکل ۱- طیف FTIR عصاره آبی گیاه شنبلیله.

Fig. 1. FTIR spectrum of aqueous extract of Trigonall foenum.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمون‌های ضدمیکروبی نشان داد که عصاره آبی گیاه شنبلیله دارای خاصیت ضدمیکروبی بالایی در برابر انواع میکروارگانیسم‌ها (باکتری گرم مثبت، گرم منفی و قارچ) بوده و فعالیت ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر می‌باشد. همچنین مشخص گردید که قطر هاله‌های عدم رشد در برهمکنش عصاره با آنتی‌بیوتیک افزایش می‌یابد بنابراین ترکیب عصاره با آنتی‌بیوتیک در بروز خاصیت ضدمیکروبی بیشتر مؤثر می‌باشد. وجود ترکیبات فنولی سبب بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در عصاره آبی گیاه شنبلیله شد. از این‌رو می‌توان از این گیاه به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی در صنعت غذا و دارو استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه 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. Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Alara, O. R., & Abayomi, O. O. (2019). Extraction, characterization and antioxidant activity of fenugreek (*Trigonella-foenum graecum*) seed oil. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(2), 349-355. https://doi.org/10.1016/j.mset.2018.12.001
2. Akhtar, N., & Mirza, B. (2018). Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian journal of chemistry*, 11(8), 1223-1235. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.01.013
3. Alizadeh behbahani, B., & Shahidi, F. (2021). Evaluation of the antimicrobial effect of *Carum copticum* essential oil on some standard microbial strains, indices of infection and food poisoning: an in vitro study. FSCT, 18 (111), 37-44.
4. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2020.
5. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2458-2467.
6. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mohebbi, M. (2012). Antimicrobial activity of Avicennia marina extracts ethanol, methanol & glycerin against *Penicillium digitatum* (citrus green mold). *Scientific Journal of Microbiology*, 1(7), 147-151.

7. Ansari pour, A., Mehrnia, M. A., Noshad, M., Barzegar, H., & Alizadeh behbahani, B. (2019). Antimicrobial effect of garlic essential oil on a number of food-borne pathogens and determination of its chemical composition and antioxidant potential. *FSCT*, 16 (91), 17-29.
8. Arbab, M., Alizadeh, E., & Shahriari Moghadam, M. (2020). Effect of aqueous and ethanolic extracts of *Trigonella foenum-graecum* seed on the quality of *Cyprinus carpio* fillet inoculated with Staphylococcus aureus. *Journal of Food Researc*h, 29(4), 29-43.
9. Babuskin, S., Babu, P. A. S., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M., & Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International journal of food microbiology*, 171, 32-40. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.011
10. Barzegar, H., Alizadeh behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2019). Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *FSCT*, 16(90), 113-125
11. Barzegar, H., Alizadeh behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Evaluation of total phenol and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* aqueous extract against some gram- positive and gram-negative bacteria. FSCT, 18 (116), 327-335.
12. Barzegar, H., Behbahani, B. A., & 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
13. Barzegar, H., Mehrnia, M. A. & Behbahani, B. A. (2019). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. *Journal of Applied Microbiology in food industry*, 4(4), pp.15-28.
14. Behbahani, B. A., & Fooladi, A. A. I. (2018). Antibacterial activities, phytochemical analysis and chemical composition Makhlaseh extracts against the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 114, 204-208. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.002
15. Behbahani, B. A., & Fooladi, A. A. I. (2018). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial pathogenesis*, 114, 299-303. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.055
16. Behbahani, B. A., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial pathogenesis*, 136, 103716. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103716
17. Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A., & Alghooneh, A. (2018). Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 114, 225-232. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.004
18. Chen, I. N., Chang, C. C., Ng, C. C., Wang, C. Y., Shyu, Y. T., & Chang, T. L. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of Zingiberaceae plants in Taiwan. *Plant foods for human Nutrition*, 63(1), 15-20. https://doi.org/10.1007/s11130-007-0063-7
19. Haque, A., Khatun, R., & Yaakob, Z. (2015). Gas chromatography mass spectrometry analysis and in vitro antibacterial activity of essential oil from *Trigonella foenum-graecum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), 1033-1036. https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.010
20. Hasanzadeh, E., Rezazadeh, S., Shamsa, S., Dolatabadi, R., Zarringhalam J. (2010). Review on phytochemistry and Therapeutic properties of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*). *J. Med. Plants*, 9(34), 1-18.
21. Jaberian, H., Piri, K., & Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food chemistry*, 136(1), 237-244. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.084
22. Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., & Soković, M. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food chemistry*, 107(2), 861-868. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.005
23. Majdi, B., Mehrnia, M. A., Barzegar, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Determination of the structure, chemical composition, antioxidant activity and the cytotoxic effect of Turmeric essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 17(2), 261-271.
24. Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Barzegar H, & Tanavar, H. (2021). *Sclerorhachis platyrachis* essential oil: Antioxidant power, total phenolic and flavonoid content and its antimicrobial activity on some Gram-positive and Gram-negative bacteria “in vitro”. *FSCT*, 18 (112), 189-198.

25. Modaresi, M., Mahdian, B. (2012). The effect of hydro-alcohol extract of *Trigonella foenum- graceum* L. on reproductive system in Balb/c. *Journal of Medicinal Herbs*, "J. Med Herb" (Formerly known as Journal of Herbal Drugs or J. Herb Drug), 2(4), 261-267.
26. Namazi, P., Barzegar, H., Alizadeh behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2021). Evaluation of functional groups of bioactive compounds, antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid content of red bell pepper extracts. *FSCT*, 18 (113), 301-311.
27. Norziah, M. H., Fezea, F. A., Bhat, R., & Ahmad, M. (2015). Effect of extraction solvents on antioxidant and antimicrobial properties of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.). *International Food Research Journal*, 22(3), 1261.
28. Shahidi, F., Yazdi F, T., Roshanak, S., Behbahani, B.A., Norouzi, N. & Vasiee, A. (2019). Antimicrobial Activity of *Lepidium draba* Extract on some Pathogenic Microorganisms "in vitro". *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, 24(85), pp.1-9.
29. Sharma, V., Singh, P., & Rani, A. (2016). Antimicrobial activity of *Trigonella foenumgraecum* L. Fenugreek). Eur Exp Biol, 7(1).
30. Singh, P., Vishwakarma, S. P., & Singh, R. L. (2014). Antioxidant, oxidative DNA damage protective and antimicrobial activities of the plant *Trigonella foenum-graecum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2497-2504. https://doi.org/10.1002/jsfa.6585
31. Sosani Gharibvand, Z., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Jooyandeh H. (2020). Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of Callistemon Citrinus Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study. JRUMS, 19(5), 463-484
32. Subhashini, N., Thangathirupathi, A., & Lavanya, N. (2011). Antioxidant activity of Trigonella foenum graecum using various in vitro and ex vivo models. Int J pharm pharm Sci, 3(2), 96-102.
33. Sulieman, A. M. E., Ahmed, H. E., & Abdelrahim, A. M. (2008). The chemical composition of fenugreek (*Trigonella foenum graceum* L) and the antimicrobial properties of its seed oil. *Gezira J. of Eng & Applied Sci*, 3(2), 52-71.
34. Tabatabai Yazdi, F., Ali Zadeh Behbahani, B., Alghoneh, A., & Zanganeh, H. (2016). Optimization of extraction of Mespilus germanica by mixture design and investigation of its effect on Infectious Microorganisms "in vitro". *FSCT*, 13(52), 131-145.
35. Vidhu, V. K., & Philip, D. (2014). Catalytic degradation of organic dyes using biosynthesized silver nanoparticles. Micron, 56, 54-62. https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.10.006
36. Wagh, P., Rai, M., Deshmukh, S. K., & Durate, M. C. T. (2007). Bio-activity of oils of Trigonella foenum-graecum and Pongamia pinnata. *African journal of Biotechnology*, 6(13).
37. Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4).
38. Yeganegi, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Asili, J., Behbahani, B. A., & Beigbabaei, A. (2018). Equisetum telmateia extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 116, 62-67. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.014

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 427- 439

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۳۹-۴۲۷

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

Full Research Paper

Identification and evaluation of the prebiotic effect of water-soluble polysaccharides extracted from green almond hull

Rezvan Shaddel[1*], Safoura Akbari-Alavijeh[1]

Received: 2021.07.28
Revised: 2021.10.12
Accepted: 2021.11.13
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S. (2022). Identification and evaluation of the prebiotic effect of water-soluble polysaccharides extracted from green almond hull. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 18 (4), 427-439.

Abstract

Introduction: Today, the incidence of non-communicable and emerging diseases is increasing due to lifestyle changes, reduced mobility and changing dietary patterns. Some clinical evidences in simulated samples and real cases show that some compounds and plant extracts have a significant effect on the prevention and even treatment of these diseases. On the other hand, due to the structural and functional diversity of plant polysaccharides, there is a great tendency among researchers to find new polysaccharides in different sources with new functional and bioactive properties. Despite extensive studies in this field, no study has been done on the extraction of polysaccharide compounds with prebiotic properties from green almond hull as one of the agricultural wastes. Therefore, the purpose of this study was to introduce a new type of synbiotic compound to balance clone microbiota and promote consumer health.

Materials and methods: In this study, after extraction of water-soluble almond hull polysaccharides (AHP) by hot water extraction and precipitation with alcohol, the chemical analysis was done. To investigate the chemical composition of AHP, phenol sulfuric acid test was used to measure total sugar and Bradford test was used to measure protein. The amount of fat and ash in the sample was measured using standard methods (AOAC, 2005) and (AOAC, 2000), respectively. The amount of uronic acid of AHP was measured by calorimetry using metahydroxyphenyl at a wavelength of 520 nm. The content of AHP phenolic compounds was investigated by Folin Siocalcu calorimetric method. Fourier transform infrared (FT-IR) was also used to identify the functional groups and the anomeric status of AHP components. The prebiotic effect of this compound was also tested by digestion resistance and also by growth stimulation of the probiotic strain of *Lactobacillus casei* ATCC 393 *in vitro* for the first time.

Results and discussion: Chemical analysis showed that AHP is a heteropolysaccharide consisting of 86.30% w/w of total sugar, 5.10% w/w protein and 3.21% w/w uronic acid. FT-IR analysis also confirmed the chemical structure of AHP as a heteropolysaccharide. The results of digestion resistance showed that 91.24% of AHP can remain stable and undecomposed after the stages of gastrointestinal digestion, while this rate was 74.94% for inulin as a commercial prebiotic. The second prebiotic property of AHP investigated in this study was the stimulation the growth of *Lactobacillus casei* ATCC 393 as probiotic in sugar-free MRS-based culture media and the results showed that AHP compared to inulin significantly increased the survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 ($p < 0.01$). The proliferation index in media containing AHP and inulin showed a significant difference and AHP stimulated the growth of *Lactobacillus casei* ATCC

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
(*Corresponding Author Email: r.shaddel@uma.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71662.1075

393 significantly more than inulin ($p < 0.01$). Therefore, to design a synbiotic product, if AHP is used as a prebiotic, the probiotic strain of *Lactobacillus casei* ATCC 393 would be a good choice.

Considering the annual production of thousands of tons of almond green hull waste in Iran and the concerns related to environmental problems caused by its accumulation, the introduction of industrially feasible and economically justified methods to produce value-added products from this agricultural waste seems essential. In the present study, polysaccharides extracted from almond green hull by hot water extraction and alcohol precipitation, which is an economically feasible method and can be implemented on an industrial scale, were introduced as a useful compound. *In vitro* studies also used culture medium containing AHP as a commercial prebiotic in comparison with culture medium containing inulin. The results showed that this compound has a good resistance to digestive conditions in the gastrointestinal tract compared to inulin. The compound was also able to stimulate the growth of the probiotic *Lactobacillus casei* ATCC 393 in culture medium. In general, in this study, a new synbiotic compound including *Lactobacillus casei* ATCC 393 and AHP was introduced as a health beneficial food additive.

Keywords: Probiotics, Prebiotics, Almond hull polysaccharides, *Lactobacillus casei* ATCC 393.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 427- 439

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۳۹-۴۲۷

مقاله علمی-پژوهشی

شناسایی و بررسی اثر پریبیوتیکی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراج شده از پوسته سبز بادام

رضوان شاددل[1*]- صفورا اکبری علویجه[1]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۷/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

چکیده

هدف از اجرای این تحقیق معرفی نوعی ترکیب سینبیوتیک جدید در جهت متعادل‌سازی میکروفلور کلون و ارتقا سلامت مصرف‌کننده بود. بدین منظور، پس از استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب پوسته سبز بادام (AHP) به روش استخراج با آب داغ و رسوب‌دهی با الکل و شناسایی آن، اثر پریبیوتیکی این ترکیب با تست مقاومت به هضم و همچنین همراه با سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 به روش برون‌تنی برای اولین بار بررسی شد. آنالیز شیمیایی نشان داد که AHP یک هتروپلی‌ساکارید متشکل از ۸۶/۳۰٪ وزنی- وزنی قند کل، ۵/۱۰٪ وزنی- وزنی پروتئین و ۳/۲۱٪ وزنی- وزنی اسید اورونیک است. آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) نیز ساختار شیمیایی AHP را به‌عنوان یک هتروپلی‌ساکارید تایید کرد. نتایج تست مقاومت به هضم نشان داد که ۹۱/۲۴٪ از AHP می‌تواند به‌صورت ثابت و تجزیه نشده پس از طی مراحل هضم گوارشی باقی بماند در حالی که این میزان برای اینولین به‌عنوان یک پریبیوتیک تجاری ۷۴/۹۴٪ به‌دست آمد. دومین خصوصیت پریبیوتیکی AHP که در این مطالعه بررسی شد تحریک رشد پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت پایه MRS بدون قند بود و نتایج نشان داد که AHP نسبت به اینولین به‌طور معناداری زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 را افزایش داد ($p<0.01$). به‌طور کلی در این تحقیق ترکیب سینبیوتیک جدید شامل *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 و AHP به‌عنوان یک افزودنی فراسودمند در مواد غذایی معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، پریبیوتیک، پوسته سبز بادام، *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393.

مقدمه

امروزه غذا علاوه بر برآورده کردن نیاز های اولیه بدن به‌عنوان یک عامل کلیدی درتأمین سلامتی انسان در نظر گرفته می‌شود، از این‌رو مبحث غذاهای فراسودمند بخش قابل توجهی از مطالعات حوزه صنعت غذا را به‌خود اختصاص داده است. این غذاها می‌بایست علاوه بر ارزش تغذیه‌ای، دارای فواید مشخصی برای سلامتی انسان باشند. در بین انواع غذاهای فراسودمند، غذاهای حاوی پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها بسیار مورد توجه واقع شده‌اند که به دلیل اثرات فیزیولوژیکی فراوان اثبات شده در مورد آنها است.

پروبیوتیک‌ها طبق تعریف تأیید شده توسط انجمن علمی بین المللی پروبیوتیک و پریبیوتیک (ISAPP[2]) در سال ۲۰۱۴ میکروارگانیسم های زنده‌ای (باکتری یا مخمر) هستند که می‌بایست از نظر متابولیکی در محصول ثابت و فعال باقی بمانند، در طول مسیر قبل از مرحله هضم به تعداد زیاد زنده مانده، خود را به سلول‌های اپیتلیال[3] روده برسانند و آثاری سودمند را در روده میزبان باقی گذارند (Hill et al., 2014). کار اصلی پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها اصلاح فلور میکروبی روده بزرگ و به دنبال آن اثرات مثبت بر عملکرد کل بدن انسان است.

امروزه در کنار کار بر روی شناسایی سویه‌های پروبیوتیک، محققان بدنبال استراتژی‌هایی جهت تشویق رشد این باکتری‌ها در روده بزرگ نیز بوده‌اند. راهکار مؤثر برای تشویق رشد پروبیوتیک‌ها، غنی‌سازی غذا با پریبیوتیک‌ها است. پریبیوتیک‌ها ترکیبات غذایی غیرقابل هضمی هستند که از طریق تحریک انتخابی رشد و فعالیت یک یا تعدادی از باکتری‌های روده بزرگ بر سلامتی میزبان اثر می‌گذارند. کربوهیدرات

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: r.shaddel@uma.ac.ir

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71662.1075
2 International scientific association of probiotics and prebiotics
3 Epithelial cells

های غیرقابل هضم (الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها)، برخی پروتئین‌ها و پپتیدها و بعضی لیپیدهای خاص به‌عنوان پریبیوتیک مطرح هستند (Biedrzycka & Bielecka, 2004). اثرات پریبیوتیکی یک ماده غذایی براساس میزان تأثیر آن بر رشد باکتری‌های مفید مانند لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتر، کاهش پاتوژن‌های روده‌ای و افزایش یا کاهش تولید متابولیت‌های میکروبی ارزیابی می‌شود (Grootaert et al., 2007).

بسیاری از ترکیبات پریبیوتیک مؤثر بر سلامتی به‌طور معمول در برخی مواد غذایی و یا منابع گیاهی خوراکی وجود دارند، ولی عدم سهولت مصرف برخی منابع گیاهی، عدم مطابقت ذائقه‌ای و یا محدودیت‌های فصلی و منطقه‌ای، امکان مصرف عمومی آنها را محدود می‌سازد. لذا به‌نظر می‌رسد جداسازی این ترکیبات از منابع جدید و شناسایی و ارزیابی خصوصیات آنها و اضافه کردن آنها به مواد غذایی، استفاده از اثرات سلامتی‌بخش آنها را امکان‌پذیر می‌سازد. پلی ساکاریدهای پریبیوتیک از منابع مختلف مانند گیاهان، برخی قارچ‌ها یا علف‌ها و گیاهان دریایی جداسازی شده و خصوصیات زیست فعال آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است (Dawood et al., 2021; do Nascimento Santos et al., 2021; Huang et al., 2019; Jayamanohar et al., 2019; Wichienchot et al., 2011; Zhu et al., 2020).

در این تحقیق استخراج پلی‌ساکاریدهای زیست فعال از پوسته سبز بادام مورد توجه قرار گرفته است. سالیانه هزاران تن از بقایای فرآیند پوست گیری در کارخانجات فرآوری بادام در سراسر کشور تولید می شود، که بخش عمده آن به ضایعات کشاورزی تبدیل شده و می‌تواند سبب آلودگی شدید محیط زیست گردد. البته این ماده برای خوراک دام نیز قابل استفاده است، اما به‌دلیل وجود مواد ضدتغذیه‌ای از جمله ترکیبات فنولی که سبب کاهش قابلیت گوارش‌پذیری علوفه، اختلالات رشد و یا ابتلا به بیماری در دام می‌گردد، مصرف آن به صورت محدود و با احتیاط است. بنابراین پوسته سبز بادام به‌عنوان یکی از انواع ضایعات کشاورزی با حجم بالا به جزء مفیدی برای استفاده‌های بیشتر تبدیل شده است. ترکیب شیمیایی پوسته سبز بادام در جدول زیر ارائه شده است (Elahi et al., 2017).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی پوسته سبز بادام بر حسب گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک (Elahi et al., 2017)

Table 1- Chemical composition of almond green hull in grams per 100 grams of dry matter (Elahi et al., 2017)

Components اجزاء تشکیل دهنده	Percentage درصد
Organic matter ماده آلی	90.08
Ash خاکستر	9.92
Crude protein پروتئین خام	10.34
Crude fat چربی خام	6.71
Fibers insoluble in neutral detergent الیاف نامحلول در شوینده خنثی	30.35
Fibers insoluble in acidic detergent الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	61.89
Total phenolic compounds کل ترکیبات فنولی	41.20
Non-fibrous carbohydrates کربوهیدرات غیر فیبری	14.13

در این تحقیق بررسی اثر پریبیوتیکی ناشی از پلی‌ساکارید استخراج شده از پوسته سبز بادام و پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 به روش برون‌تنی برای اولین بار صورت می‌گیرد. در مطالعات برون‌تنی از بستر محیط کشت حاوی ترکیبات پریبیوتیک استخراج شده در مقایسه با محیط کشت حاوی گلوکز (کنترل منفی) و اینولین (کنترل مثبت) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

پوسته سبز بادام سفید (محبعلی) که به صورت آفتابی خشک شده بودند، از روستای مارکده (اصفهان، ایران) در مهرماه سال ۹۸ در دو مرحله تهیه شد و به دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. اینولین از شرکت اورافتی (Orafti HPX، بلژیک) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک (آلمان) و سیگما (امریکا) تهیه شدند.

استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از پوسته سبز بادام

پوسته‌های سبز بادام خشک شده توسط آسیاب برقی پودر شده و با الک شماره مش ۳۰ الک شدند. سپس از الکل ۸۰٪ به‌منظور حذف چربی، قندهای آزاد و ترکیبات فنولیک و رنگی استفاده شد. سپس ترکیبات حل شده در الکل توسط صافی از جنس پارچه نایلونی جدا و مواد باقیمانده بر روی صافی، برای حذف بقایای چربی، قندها و ترکیبات فنولی با الکل تازه شستشو شد و در آون (Wolf، انگلستان) خشک گردید. سپس، پلی‌ساکاریدهای محلول در آب به روش Tadayoni و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از آب داغ و رسوب‌دهی با اتانول استخراج شد (Tadayoni et al., 2015). استفاده از این فرآیند به سبب استفاده از حرارت بالا منجر به دناتوره شدن پروتئین‌ها و بسیاری از ترکیبات حساس به حرارت می‌شود. همچنین بسیاری از پلی‌ساکاریدهای سنگین و نامحلول نیز در حرارت های بالا در آب محلول شده و به فاز آبی وارد می شوند. رسوبات حاصل با سانتریفوژ (سیگما، 6K15، آلمان) تحت شرایط ۲۰۰۰ g و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد و برای حذف ناخالصی‌ها، چندین بار با الکل مطلق شستشو داده شدند (Tadayoni et al., 2015). پس از الکل‌زدایی، عصاره حاوی پلی‌ساکاریدهای پوسته سبز بادام[1] ابتدا در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد (Dairei، ژاپن) منجمد و سپس با استفاده از خشک کن انجمادی (Christ Alpha-1-4، آلمان) در دمای ۵۵- درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت خشک شد.

آنالیز شیمیایی و شناسایی ساختار شیمیایی AHP

آنالیز شیمیایی AHP

به‌منظور بررسی ترکیب شیمیایی AHP، از تست فنول سولفوریک اسید برای اندازه گیری قند کل (Jain et al., 2007) و از تست بردفورد برای اندازه‌گیری پروتئین (Wichienchot et al., 2010) استفاده شد. میزان چربی و خاکستر نمونه به‌ترتیب با استفاده از روش‌های AOAC (۲۰۰۵) و AOAC (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. میزان اورونیک اسید AHP به روش کالری‌متری با استفاده از متاهیدروکسی دیفنیل در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). محتوای ترکیبات فنولیک AHP با روش کالریمتری فولین سیوکالچو بررسی شد (Taylor et al., 2015).

بازدهی استخراج AHP با استفاده از فرمول ۱ محاسبه شد (Xie et al., 2013):

$$\text{بازده}\ (\%) = (W_e / W_0) \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

W_e: وزن خشک AHP بر حسب گرم.

W_0: وزن خشک پوسته بادام بر حسب گرم.

تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

پس از مخلوط کردن پودر AHP با پودر بروميد پتاسیم، قرص مورد نیاز با استفاده از دستگاه پرس تهیه شد. طیف‌سنجی مادون قرمز در دامنه طول موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} با استفاده از دستگاه تبدیل فوریه مادون قرمز FTIR (JASCO، ژاپن) ثبت گردید (Tadayoni et al., 2015).

بررسی خصوصیات فراسودمند AHP

مقاومت به هضم AHP

برای بررسی مقاومت به هضم AHP، شبیه‌سازی شیره‌های گوارشی بر اساس روش Jain و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد (Jain et al., 2007). برای شبیه‌سازی فرآیند هضم و شیره‌های گوارشی سه مرحله در نظر گرفته شد:

- بافر ۱ (شبیه‌سازی شیره معده): کلرید سدیم (۲ گرم)، اسید کلریدریک (۷ میلی‌لیتر) (pH= ۱/۲).
- بافر ۲ (شبیه‌سازی مخلوط معده و روده): بافرهای ۱ و۳ به نسبت ۳۹:۶۱ (pH= ۴/۵).
- بافر ۳ (شبیه‌سازی محیط روده): پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۶/۸ گرم)، سود (۱۹۰ میلی‌لیتر)، آلفاآمیلاز (۲ واحد در هر میلی لیتر) (pH= ۷/۴).

برای بررسی مقاومت به هضم AHP، طی سه مرحله از بافرهای تهیه شده استفاده گردید. ابتدا بافر ۱ به نمونه AHP اضافه گردیده و در انکوباتور شیکردار (۱۰۰ دور در دقیقه)، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. پس از یک ساعت نمونه سانتریفوژ شده و از مایع رویی برای اندازه گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. قند آزاد به روش DNS اندازه‌گیری شده و درصد هیدرولیز بر اساس میزان قند آزاد شده نسبت به قند کل گزارش شد. در مرحله دوم بافر شماره ۲ به نمونه اضافه شده و در انکوباتور شیکردار (IKA® KS 4000 i control، آلمان) با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت یک ساعت قرار گرفت. پس از یک ساعت نمونه سانتریفوژ شده و از مایع رویی برای اندازه‌گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. در مرحله سوم هضم به بافر ۳ آنزیم آلفاآمیلاز اضافه شده تا مقاومت آن به هیدرولیز آنزیمی نیز ارزیابی شود و در انکوباتور شیکردار (۱۰۰دور در دقیقه)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت (Wichienchot et al., 2010). پس از گذشت زمان یک ساعت نمونه سانتریفوژ شده و از مایع رویی برای اندازه‌گیری قند آزاد نمونه‌برداری شد. تمام مراحل گفته شده برای اینولین به‌عنوان پریبیوتیک شاخص تجاری نیز انجام شده وکلیه آزمایشات مربوطه با

1 Almond hull polysaccharides (AHP)

سه تکرار انجام شد. برای هر کدام از مراحل گفته شده درصد هیدرولیز به‌عنوان میزان قند احیا به میزان قند کل طبق فرمول ۲ محاسبه گردید (Wichienchot et al., 2010):

درصد هیدررولیز (٪) = (قند آزاد احیا)/ (قند احیا اولیه–قندکل) ×۱۰۰ (۲)

تحریک رشد پروبیوتیک توسط AHP

لاکتوباسیلوس کازئی ATCC 393 که خصوصیات پروبیوتیکی آن قبلاً به اثبات رسیده است به‌عنوان یک سویه پروبیوتیک شناخته شده تجاری، برای رشد در حضور پلی‌ساکاریدهای مورد مطالعه شامل AHP و اینولین انتخاب شدند.

برای بررسی فعالیت پریبیوتیکی AHP، محیط MRS پایه بدون قند برای رشد سویه پروبیوتیک انتخاب شد. برای آماده‌سازی تیمارهای مختلف، محیط MRS پایه حاوی AHP (۲٪ w/v) در مقایسه با محیط حاوی اینولین (۲٪ w/v)، محیط کنترل مثبت از محیط MRS پایه حاوی گلوکز (۲٪ w/v) و محیط کنترل منفی از محیط MRS پایه بدون قند تهیه شد.

کشت های *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت حاوی گلیسرول در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. پس از خروج از فریزر تحت شرایط استریل محتویات هر میکروتیوب به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع استریل، منتقل شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۸ ساعت، انکوبه‌گذاری شد. سپس، سویه پروبیوتیک فعال شده به نسبت (v/v) ۲٪ به محیط‌های مذکور اضافه گردید. از محیط های مذکور در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه‌برداری و در شرایط مشابه با فعال‌سازی انکوبه‌گذاری شد. سپس طبق روش Miles و همکاران (۱۹۳۸) کشت و شمارش انجام شد (Miles et al., 1938). pH نمونه‌ها نیز طی هر نمونه‌برداری ثبت شد. همچنین شاخص تکثیر (PI)[1] بین زمان‌های صفر و ۷۲ ساعت با استفاده از فرمول ۳ در مورد هر تیمار محاسبه شد (Wang et al., 2015):

$$PI = \log B - \log A \quad (۳)$$

B: تعداد باکتری‌ها در زمان صفر (CFU/mL).

A: تعداد باکتری‌ها در زمان ۷۲ ساعت (CFU/mL).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمایشات در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و داده‌های به‌دست آمده به صورت (انحراف معیار ±میانگین) گزارش شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹) تحلیل گردید. آنالیز واریانس یکطرفه و با آزمون LSD به‌منظور مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

استخراج پلی‌ساکارید از پوسته سبز بادام و بررسی ترکیب شیمیایی آن

ترکیب شیمیایی AHP در جدول ۲ ارائه شده است. میزان قند کل به روش فنول سولفوریک اسید بیانگر خلوص پلی‌ساکارید استخراج شده است. در این مطالعه این میزان ۸۶/۳۰٪ به‌دست آمد که نشان‌دهنده خلوص قابل قبول عصاره استخراج شده است. با توجه به اینکه اغلب پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراجی از منابع گیاه ساختار پکتینی دارند معمولاً در آنالیز شیمیایی، میزان اورونیک اسید نیز گزارش می‌شود. در این مطالعه، اورونیک اسید، خاکستر، پروتئین، ترکیبات فنولیک و چربی به مقدار اندکی در AHP وجود داشتند که نشان می‌دهد مرحله چربی‌زدایی به‌طور کامل پروتئین، چربی‌ها و ترکیبات فنولیک را حذف نکرده است.

بازده استخراج AHP ۵/۸۵٪ بر حسب وزن خشک پوسته سبز بادام بود. باید توجه داشت که بازده استخراج پلی‌ساکاریدها قابل افزایش است. البته استفاده از پیش تیمارهای اسیدی، قلیایی یا آنزیمی برای افزایش بازده استخراج می‌تواند به‌کار رود اما می‌بایست با احتیاط استفاده شوند زیرا باعث شکستن پلی‌سکاریدها و کاهش خلوص عصاره به‌دست آمده می‌شوند (Carvalho et al., 2009). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با برخی مطالعات مشابه همخوانی داشت. برای مثال، در مطالعه Tadayoni و همکاران (۲۰۱۵) میزان بازده استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از بلوط ۵٪ و خلوص پلی‌ساکارید به‌دست آمده را ۹۰٪ گزارش شده است. روش استخراج در مطالعه ایشان کاملاً مشابه با این تحقیق بود (Tadayoni et al., 2015). Luo و همکاران نیز (۲۰۰۹) بازده استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از گیاه *Dendrobium nobile Lindl.* را حدود ۵٪ محاسبه کردند (Luo et al., 2009). Xie و همکاران (۲۰۱۳)، بازده استخراج پلی‌ساکارید جدا شده از برگ‌های گیاه *Cyclocarya paliurus* را ۲/۱۶٪ اعلام کردند و ترکیب شیمیایی آن شامل ۶۴/۸٪ قند کل، ۲۳/۵٪ اورونیک اسید و ۹/۲۶٪ پروتئین بود (Xie et al., 2013).

شناسایی ساختار شیمیایی AHP با طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)

به‌منظور شناسایی گروه‌های عاملی و وضعیت آنومری اجزای تشکیل‌دهنده AHP از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده

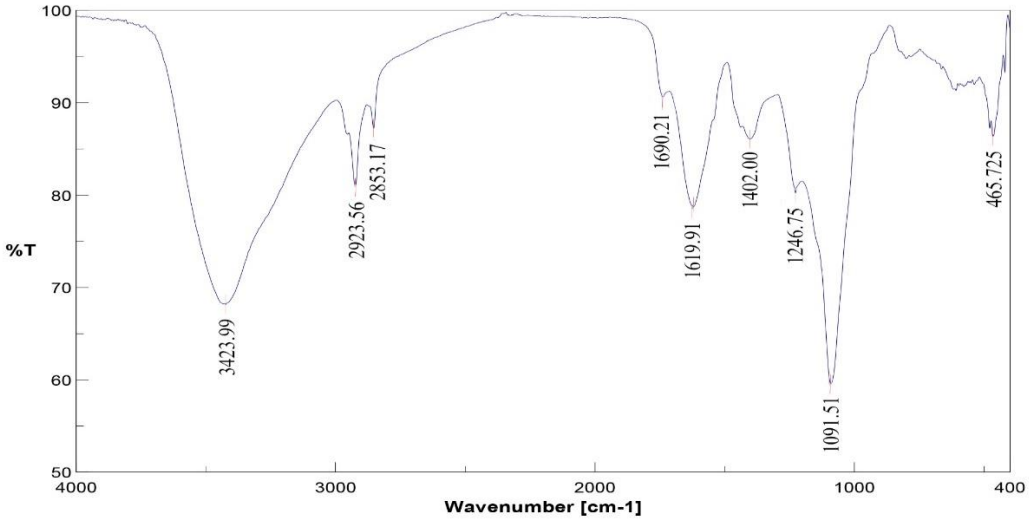
1 Proliferative Index (PI)

شد. این آنالیز در محدوده جذبی ۴۰۰ تا cm^{-1} ۴۰۰۰ انجام شد. همانطور که در شکل ۱ ارائه شده است باند جذبی در cm^{-1} ۳۴۲۳/۹۹ مبین وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختار AHP است و جذب در منطقه cm^{-1} ۲۹۲۳/۵۶ مربوط به ارتعاشات کششی و خمشی در باندهای C-H است (Wang et al., 2015; Zhu et al., 2013). به‌علاوه باندهای جذبی در مناطق cm^{-1} ۱۶۹۰/۲۱ و cm^{-1} ۱۶۱۹/۹۱ مربوط به ارتعاشات کششی باندهای C=O در گروه‌های کربوکسیلیک آزاد و استریفایه شده است که نشان‌دهنده حضور اورونیک اسید در ترکیب AHP است (Nep et al., 2015; Xie et al., 2013). جذب ضعیف در منطقه cm^{-1} ۱۴۰۲/۰۰ مربوط به ارتعاشات خمشی N-H می‌باشد، که مؤید حضور پروتئین در ترکیب AHP است (Wang et al., 2015). باند موجود در cm^{-1} ۱۲۴۶/۷۵ را می‌توان مربوط به ارتعاشات خمشی C-O-H و تغییر شکل‌های کششی باندهای C-H دانست (Tadayoni et al., 2015; Xie et al., 2013). جذب در cm^{-1} ۱۰۹۱/۵۱ مربوط به وجود حلقه پیرانوز است (Luo et al., 2009; Zhu et al., 2013). به‌طور معمول جذب بین ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ به‌عنوان منطقه مخصوص پلی‌ساکاریدها در نظر گرفته می‌شود و عمدتاً نمایانگر ساختار سطحی و ایزومرهای مولکول‌های تشکیل‌دهنده آن است (Xie et al., 2013). در مطالعات گذشته نیز طیف‌های مشابهی در مورد پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراج شده از بلوط (Tadayoni et al., 2015) و *Rosa damascena*، *Calendula officinali* و *Matricaria chamomilla* (Slavov et al., 2016) گزارش شده است. به‌طور کلی طیف تبدیل فوریه مادون قرمز ضمن تأیید نتایج به‌دست آمده قبلی مبین آن است که AHP یک هتروپلی‌ساکارید حاوی اورونیک اسید و پروتئین می‌باشد.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی AHP.

Table 2- Chemical composition of AHP.

Components اجزاء سازنده	% W-W درصد وزنی- وزنی
Total sugar قند کل	86.30 %
Uronic acid اورونیک اسید	3.21%
Ash خاکستر	3.08%
Protein پروتئین	5.10%
Phenolic compounds ترکیبات فنولیک	2.01%
Fat چربی	0.3%



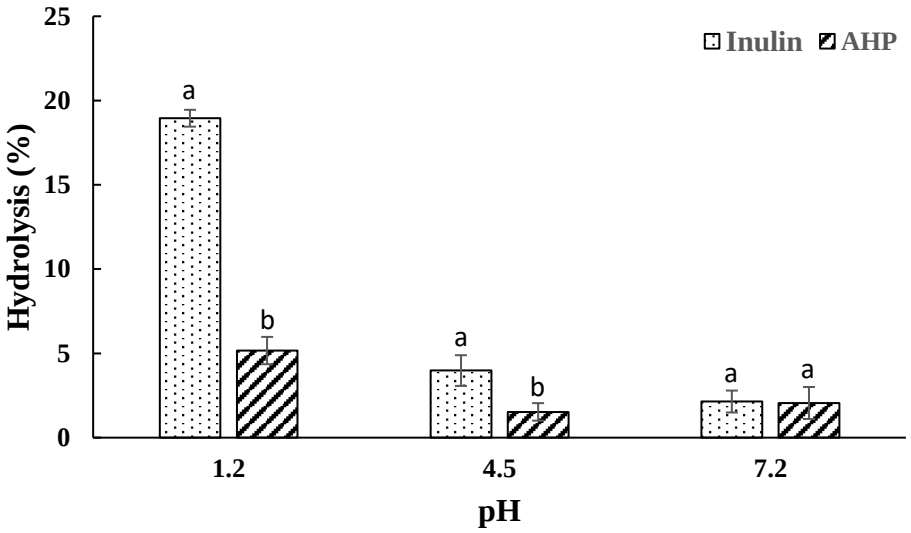
شکل ۱- طیف تبدیل فوریه مادون قرمز AHP.

Fig. 1. FTIR spectra of AHP.

بررسی خصوصیات فراسودمند AHP

مقاومت به هضم AHP

اولین قدم برای بررسی قابلیت پریبیوتیکی یک پلی‌ساکارید، مقاومت آن نسبت به اسیدیته دستگاه گوارش و شیره‌های گوارشی است. یک ترکیب پریبیوتیک می‌بایست از قسمت فوقانی لوله گوارش سالم عبور کرده و به روده بزرگ برسد و در آنجا توسط میکروب‌های پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرد. به‌منظور بررسی مقاومت AHP به هضم، ترکیبی از هضم اسیدی و آنزیمی در سه مرحله، شبیه‌سازی شد و درجه هیدرولیز، با اندازه‌گیری میزان قند احیا و قند کل، پس از انجام هضم در مقایسه با مقادیر اولیه به‌دست آمد. همچنین از اینولین به عنوان یک پریبیوتیک شاخص تجاری در کنار نمونه مورد مطالعه استفاده شد. شکل ۲ درصد هیدرولیز AHP را در مراحل مختلف هضم تحت تأثیر بافرهای با pHهای مختلف نشان می‌دهد.



شکل ۲- مقاومت AHP در مراحل مختلف هضم با استفاده از بافرهای با pH های شبیه سازی شده.

Fig. 2 AHP resistance in different stages of digestion using buffers with simulated pHs.

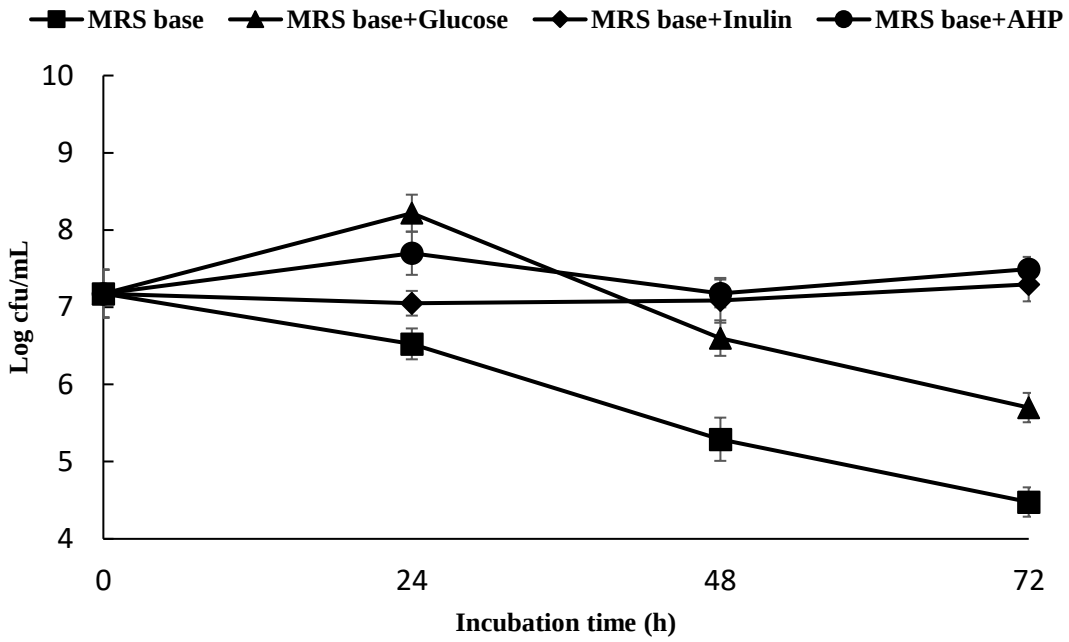
- ab: تفاوت میانگین های دارای حروف غیر مشترک روی ستون مشابه با آزمون LSD در سطح ۱ درصد معنی دار است (p<۰/۰۱).
- نتایج، میانگین سه تکرار است.

مطابق با شکل ۲، بافر شبیه سازی شده معده (pH ۱/۲) AHP را به میزان ۰/۸۱ ±۵/۱۷٪ هیدرولیز کرد که به‌طور معناداری از هیدرولیز اینولین در این بافر (۰/۵۰ ±۱۸/۹۵٪) کمتر بود (p<0.01). این پدیده با مطالعات گذشته همخوانی دارد. Gllibowski و Bukowska (۲۰۱۱) نیز تخریب شدید اینولین را تحت pHهای اسیدی (کمتر از ۴) گزارش کردند (Gllibowski & Bukowska, 2011). بافر با pH ۴/۵ AHP را به میزان ۰/۵۲ ±۱/۵۳٪ هیدرولیز کرد، در حالی که اینولین ۰/۹۱ ±۳/۹۷٪ هیدرولیز شد که به‌طور معناداری نسبت به AHP بیشتر بود (p<0.01). در این مرحله پایداری اینولین نسبت به شرایط اسیدی بیشتر بود که مؤید این موضوع است که اینولین نسبت به شرایط نسبتاً اسیدی تا خنثی از نظر شیمیایی مقاوم‌تر است (Gllibowski & Bukowska, 2011). در مرحله سوم هیچ تفاوت معناداری بین درصد هیدرولیز AHP (۰/۹۵ ±۲/۰۶٪) و اینولین (۰/۶۵ ±۲/۱۴٪) مشاهده نشد (p>0.01) که نشان می‌دهد AHP و اینولین هر دو نسبت به شرایط خنثی و آنزیم های گوارشی مقاوم‌اند. نتایج این بخش نشان داد که ۹۱/۲۴٪ از AHP می تواند به صورت ثابت و تجزیه نشده پس از طی مراحل هضم گوارشی شامل عبور از معده و روده کوچک، باقی مانده و خود را به کلون رسانده و توسط فلور میکروبی روده قابل استفاده خواهند بود که این میزان برای اینولین ۷۴/۹۴٪ به‌دست آمد. Wichienchot و همکاران (۲۰۱۱) محدوده وسیعی از مقاومت به هضم اسیدی و آنزیمی را برای تعداد زیادی از پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از میوه‌ها و سبزیجات بومی تایلند گزارش کردند که بسته به تفاوت های ساختاری و منبع استفاده شده، بین ۳۳٪ تا ۷۰٪ بوده است (Wichienchot et al., 2011). آنها همچنین در مطالعه‌ای دیگر حداکثر مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج شده از بخش گوشتی گیاه پیتایا را ۴٪ گزارش کردند (Wichienchot et al., 2010). Firdaus و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که پلی‌ساکارید استخراج شده از بامبو بیش از ۹۹ درصد مقاومت به هضم نشان داد (Firdaus et al., 2012). بررسی‌های انجام شده بر روی مقاومت به هضم پلی ساکاریدهای استخراج شده از گیاهان مختلف نشان داده است که میزان

مقاومت آنها در برابر مراحل مختلف هضم به تفاوت‌های ساختاری آنها بر می‌گردد و همین امر مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر را مشکل می‌سازد. به‌طور کلی به دلیل پایداری بالای AHP نسبت به اینولین می‌توان نتیجه گرفت که این پلی‌ساکارید به‌عنوان یک عامل پریبیوتیک در غذاهای فراسودمند قابل استفاده است.

تحریک رشد پروبیوتیک توسط AHP

دومین خصوصیت پریبیوتیکی AHP که در این مطالعه بررسی شد تحریک رشد پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت پایه MRS بدون قند بود که با ۲٪ AHP و یا ۲٪ اینولین به صورت جداگانه غنی‌سازی شده بودند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس تعداد باکتری‌ها و pH محیط کشت در فواصل ۲۴ ساعته به مدت ۷۲ ساعت بررسی گردید. همچنین میزان افزایش جمعیت باکتریایی در طول ۷۲ ساعت تخمیر به‌عنوان شاخص تکثیر محاسبه شد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود، AHP رشد پروبیوتیک مورد مطالعه را بیشتر از اینولین تحریک کرد. محیط کشت پایه MRS که به‌عنوان کنترل استفاده شد محیط مغذی برای سویه پروبیوتیک نبود و جمعیت باکتریایی در طول مدت ۷۲ ساعت بیشترین کاهش را نشان داد. در مورد محیط MRS حاوی گلوکز، در طول ۲۴ ساعت اولیه تخمیر، افزایش جمعیتی بیشتر از محیط‌های حاوی AHP و اینولین مشاهده شد، به دلیل اینکه گلوکز توسط باکتری‌ها به سرعت مصرف می‌شود. اما پس از ۷۲ ساعت جمعیت باکتری‌ها در حضور گلوکز به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. در حالی که در محیط‌های حاوی AHP و اینولین کاهش جمعیت با سرعت بسیار کمتری اتفاق افتاد.



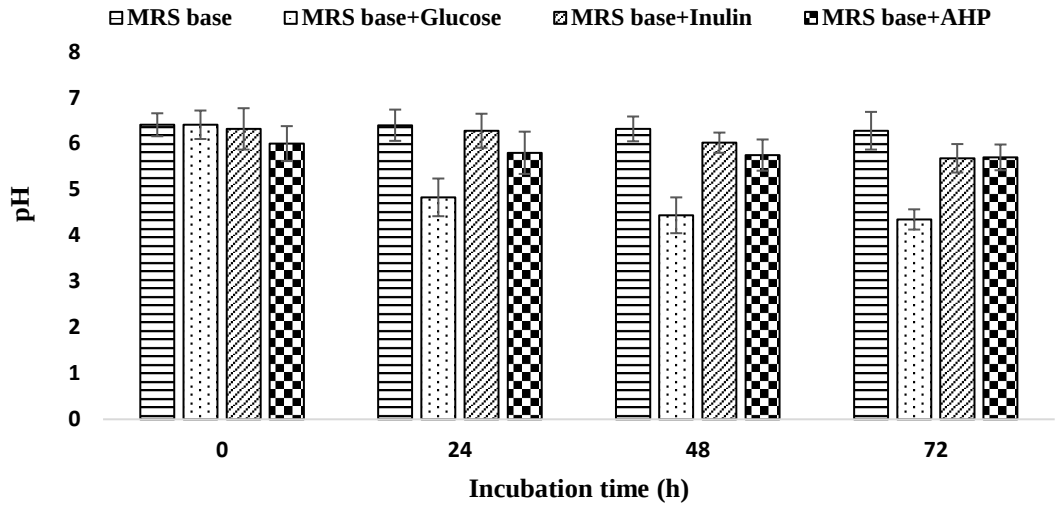
شکل ۳- اثر AHP بر جمعیت *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت پایه بدون قند در مقایسه با اینولین.
- کنترل منفی: محیط کشت پایه؛ کنترل مثبت: محیط کشت پایه + گلوکز.
- نتایج، میانگین سه تکرار است.

Fig. 3. Effect of AHP on population of *L. casei* ATCC 393 in sugar free MRS base medium compared to inulin.
-Negative control: MRS base; Positive control: MRS base + Glucose.
-Results are the average of three replicates (Mean ± SD (n=3)).

Tadayoni و همکاران (۲۰۱۵) نیز نتایج مشابهی را در مورد پلی ساکاریدهای استخراج شده از بلوط مشاهده کردند. آنها گزارش کردند که پلی‌ساکاریدهای جدا شده از بلوط نسبت به اینولین رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 را به‌طور معناداری بیشتر تحریک می‌کند (Tadayoni et al., 2015). طبق تعریف Huebner و همکاران (۲۰۰۷) قابلیت پری‌بیوتیکی یک پلی‌ساکارید به تأثیرآن بر رشد و زنده مانی میکروارگانیسم در مقایسه با رشد آن میکروب در محیط حاوی قند ساده مانند گلوکز بر می‌گردد. این موضوع به پیچیدگی ساختاری ترکیبات پری‌بیوتیک و عدم دسترسی به قند ساده در محیط رشد میکروب مربوط می‌شود. در محیط‌های حاوی قند ساده، به دلیل پدیده

مهار کاتابولیکی و به دنبال آن مهار فعالیت آنزیم‌ها رشد میکروب‌ها پس از مدت کوتاهی محدود می‌شود (Huebner et al., 2008). اما در محیط‌های حاوی ترکیبات پریبیوتیک به دلیل پیچیدگی ساختار، تولید آنزیم‌های بیشتر که برای متابولیزه شدن ترکیبات غذایی لازم است در پروبیوتیک‌ها القا شده و به آنها قدرت حفظ ثبات و پایداری می دهد (Firdaus et al., 2012).

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، روند کاهش pH در محیط غنی شده با گلوکز بر خلاف محیط‌های کشت حاوی AHP و اینولین در مورد سویه پروبیوتیک مورد مطالعه سریع‌تر است. نتایج نشان داد که مصرف سریع گلوکز اسیدیته محیط کشت را افزایش می‌دهد که این امر برای رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط حاوی گلوکز مطلوب نیست (Huebner et al., 2008). در دسترس بودن قندهای ساده به‌عنوان یک منبع ساده کربن در محیط کشت حاوی گلوکز باعث پدیده مهار کاتابولیکی شده و تولید اسید را در این محیط بیشتر کرده است. تأخیر در متابولیزه شدن AHP و اینولین نیز به دلیل پیچیدگی ساختار آنها بوده که باعث القای مسیرهای متابولیکی متفاوت در حین رشد می‌گردد (Tadayoni et al., 2015). در جدول ۳ شاخص تکثیر پروبیوتیک های مورد مطالعه در محیط‌های کشت مختلف ارائه شده است.



شکل ٤- اثر AHP بر میزان اسیدسازی *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط کشت پایه بدون قند در مقایسه با اینولین.
- کنترل منفی: محیط کشت پایه؛ کنترل مثبت: محیط کشت پایه + گلوکز.
- نتایج، میانگین سه تکرار است.

Fig. 4. Effect of AHP on acidifying activity of *L. casei* ATCC 393 in sugar free MRS base medium compared to inulin.
-Negative control: MRS base; Positive control: MRS base + Glucose.
-Results are the average of three replicates (Mean ± SD (n=3)).

نتایج نشان داد که AHP نسبت به اینولین به‌طور معناداری زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 را افزایش داد ($p<0.01$). شاخص تکثیر در محیط‌های حاوی AHP و اینولین تفاوت معناداری نشان داد و AHP رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 را به‌طور معناداری بیشتر از اینولین تحریک کرد ($p<0.01$). بنابراین برای طراحی یک محصول سین‌بیوتیک، در صورتی که از AHP به‌عنوان پری‌بیوتیک استفاده شود می‌توان از سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 استفاده کرد. در مطالعات مختلف با توجه به تفاوت در ساختار و مقاومت به هضم متفاوت، تفاوت در محیط‌های کشت از لحاظ اجزاء تشکیل‌دهنده، تفاوت گونه‌های پروبیوتیک و دوره زمانی رشد مورد مطالعه و غلظت‌های مختلف مورد بررسی از ترکیب پری بیوتیک، امکان مقایسه نتایج مشکل می‌شود. به همین دلیل در این مطالعه از اینولین به‌عنوان یک پری‌بیوتیک شاخص تجاری استفاده شد تا به همراه نتایج به‌دست آمده در بخش مقاومت به هضم، پری‌بیوتیک بودن AHP اثبات گردد. Wang و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از کلزا رشد برخی سویه‌های پروبیوتیک از قبیل *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *بیفیدوباکتریوم ادولسنتیس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم اینفنتیس* را تحریک کرد (Wang et al., 2015). در مطالعه Wichienchot و همکاران (۲۰۱۱) اولیگوساکارید استخراج شده از بخش گوشتی پیتایا توانست رشد *لاکتوباسیلوس دلبروکی* را پس از ۴۸ ساعت به میزان دو سیکل لگاریتمی افزایش دهد. در حالی که در حضور اینولین، تنها یک سیکل

لگاریتمی جمعیت این باکتری بیشتر شد (Wichienchot et al., 2011). در مطالعه Firdaus و همکاران (۲۰۱۲) اثر پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از بامبو بر باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* در مدت زمان ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها مشاهده کردند پلی‌ساکارید مطالعه شده بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها اثر مثبت داشته است. به‌طوریکه پس از طی ۷۲ ساعت پروبیوتیک‌های مورد استفاده نسبت به گروه کنترل، جمعیت بیشتری داشتند. مکانیسم پیشنهادی برای اثر پلی‌ساکارید استخراج شده آن است که پیچیدگی ساختار باعث شده مدت زمان طولانی‌تری برای متابولیزه کردن آن لازم باشد و در نتیجه میکروب مدت زمان بیشتری از نظر منبع غذایی تأمین است (Firdaus et al., 2012).

جدول ۳- شاخص تکثیر *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 در محیط های کشت مختلف.

Table 3- Proliferation index of Lactobacillus casei ATCC 393 in different culture media.

Proliferation index شاخص تکثیر	Culture media محیط کشت
-2.70 ±0.12 [d]	MRS base medium محیط کشت پایه
-1.47 ±0.05 [c]	MRS base+ Glucose محیط کشت پایه+ گلوکز
0.12 ±0.04 [b]	MRS base+ Inulin محیط کشت پایه+ اینولین
0.31 ±0.07 [a]	MRS base+ AHP محیط کشت پایه+ AHP

– ab: تفاوت میانگین های دارای حروف غیرمشترک با آزمون LSD در سطح ۱ درصد معنی‌دار است ($p<0.01$).

– نتایج، میانگین سه تکرار است.

–ab: the difference between the averages with non-common letters is significant with the LSD test at the level of 1% ($p<0.01$).

-Results are the average of three replicates (Mean ± SD (n=3)).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از پوسته سبز بادام را به روش استخراج با آب داغ و رسوب‌دهی با الکل که روشی مقرون به صرفه از نظر اقتصادی و با قابلیت اجرا در مقیاس صنعتی است، به عنوان یک ترکیب فراسودمند معرفی گردید. در مطالعات برون‌تنی نیز از بستر محیط کشت حاوی AHP در مقایسه با محیط کشت حاوی اینولین به‌عنوان یک پری‌بیوتیک تجاری استفاده شد. نتایج نشان داد که این ترکیب در مقایسه با اینولین نسبت به شرایط هضم در لوله گوارش مقاومت خوبی دارد. همچنین این ترکیب توانست رشد پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 را در محیط کشت تحریک کند. به‌طور کلی در این تحقیق ترکیب سین‌بیوتیک جدید شامل *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 393 و AHP به‌عنوان یک افزودنی فراسودمند در مواد غذایی معرفی شد.

منابع

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2005). Method of analysis Gaithersburg. *AOAC International, Gaithersburg, MD*, 1–38.
2. Biedrzycka, E., & Bielecka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science and Technology*, *15*(3–4), 170–175. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.014. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.014
3. Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, *54*(2), 484–489. https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1
4. Carvalho, A. F. U., Portela, M. C. C., Sousa, M. B., Martins, F. S., Rocha, F. C., Farias, D. F., & Feitosa, J. P. A. (2009). Physiological and physico-chemical characterization of dietary fibre from the green seaweed Ulva fasciata Delile. *Brazilian Journal of Biology*, *69*(3), 969–977.
5. Dawood, D. H., Darwish, M. S., El-Awady, A. A., Mohamed, A. H., Zaki, A. A., & Taher, M. A. (2021). Chemical characterization of Cassia fistula polysaccharide (CFP) and its potential application as a prebiotic in synbiotic preparation. *RSC Advances*, *11*(22), 13329–13340.
6. do Nascimento Santos, D. K. D., da Silva Barros, B. R., da Cruz Filho, I. J., Júnior, N. da S. B., da Silva, P. R., do Bomfim Nascimento, P. H., de Lima, M. do C. A., Napoleão, T. H., & de Melo, C. M. L. (2021). Pectin-like

polysaccharide extracted from the leaves of Conocarpus erectus Linnaeus promotes antioxidant, immunomodulatory and prebiotic effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *26*, 100263. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2021.100263

7. Elahi, M. Y., Kargar, H., Dindarlou, M. S., Kholif, A. E., Elghandour, M. M. Y., Rojas-Hernández, S., Odongo, N. E., & Salem, A. Z. M. (2017). The chemical composition and in vitro digestibility evaluation of almond tree (Prunus dulcis DA Webb syn. Prunus amygdalus; var. Shokoufeh) leaves versus hulls and green versus dry leaves as feed for ruminants. *Agroforestry Systems*, *91*(4), 773–780. https://doi.org/10.1007/s10457-016-9964-5
8. Firdaus, A., Nurul, M., Mustafa, S., Hashim, D., & Manap, Y. A. (2012). Prebiotic Activity of Polysaccharides Extracted from Gigantochloa Levis (Buluh beting) Shoots. *Molecules*, *17*, 1635–1651. https://doi.org/10.3390/molecules17021635
9. Gllibowski, P., & Bukowska, A. (2011). The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stabilityH. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, *10*(2), 189–196. https://doi.org/10.1007/s00217-004-1098-8
10. Grootaert, C., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(2), 64–71. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.08.004
11. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506–514. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66
12. Huang, F., Liu, H., Zhang, R., Dong, L., Liu, L., Ma, Y., Jia, X., Wang, G., & Zhang, M. (2019). Physicochemical properties and prebiotic activities of polysaccharides from longan pulp based on different extraction techniques. *Carbohydrate Polymers*, *206*, 344–351. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.012
13. Huebner, J., Wehling, R. L., Parkhurst, A., & Hutkins, R. W. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, *18*(3), 287–293. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.013
14. Jain, S. K., Jain, A., Gupta, Y., & Ahirwar, M. (2007). Design and development of hydrogel beads for targeted drug delivery to the colon. *AAPS PharmSciTech*, *8*(3), 34–41. https://doi.org/10.1208/pt0803056
15. Jayamanohar, J., Devi, P. B., Kavitake, D., Priyadarisini, V. B., & Shetty, P. H. (2019). Prebiotic potential of water extractable polysaccharide from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Lwt*, *101*, 703–710. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.089
16. Luo, A., He, X., Zhou, S., Fan, Y., He, T., & Chun, Z. (2009). In vitro antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide derived from Dendrobium nobile Lindl. extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, *45*(4), 359–363. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.008
17. Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, *38*(6), 732–749. https://doi.org/10.1017/S002217240001158X
18. Nep, E. I., Sims, I. M., Morris, G. A., & Kontogiorgos, V. (2015). Evaluation of some important physicochemical properties of starch free grewia gum. *Food Hydrocolloids*, *15*, 77–76. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.016.
19. Slavov, A., Panchev, I., Kovacheva, D., & Vasileva, I. (2016). Physico-chemical characterization of water-soluble pectic extracts from Rosa damascena, Calendula officinalis and Matricaria chamomilla wastes. *Food Hydrocolloids*, *61*, 469–476. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.006
20. Tadayoni, M., Sheikh-Zeinoddin, M., & Soleimanian-Zad, S. (2015). Isolation of bioactive polysaccharide from acorn and evaluation of its functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *72*, 179–184. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.015
21. Taylor, P., Woisky, R. G., & Salatino, A. (2015). control Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, *April*, 37–41. https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961
22. Wang, X., Huang, M., Yang, F., Sun, H., Zhou, X., Guo, Y., Wang, X., & Zhang, M. (2015). Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics in vitro. *Carbohydrate Polymers*, *125*, 232–240. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.040
23. Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., & Rastall, R. a. (2010). *Oligosaccharides of pitaya* (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, *120*(3), 850–857. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.026
24. Wichienchot, S., Thammarutwasik, P., Jongjareonrak, A., Chansuwan, W., Hmadhlu, P., Hongpattarakere, T., Itharat, A., & Ooraikul, B. (2011). Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, *33*(5), 517.
25. Xie, J.-H., Liu, X., Shen, M. Y., Nie, S. P., Zhang, H., Li, C., Gong, D. M., & Xie, M. Y. (2013). Purification, physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from Cyclocarya paliurus leaves. *Food Chemistry*, *136*(3), 1453–1460. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.078

26. Zhu, J., Liu, W., Yu, J., Zou, S., Wang, J., Yao, W., & Gao, X. (2013). Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of Lycium barbarum L. *Carbohydrate Polymers*, *98*(1), 8–16. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.057
27. Zhu, W., Zhou, S., Liu, J., McLean, R. J. C., & Chu, W. (2020). Prebiotic, immuno-stimulating and gut microbiota-modulating effects of Lycium barbarum polysaccharide. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *121*, 109591. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109591

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p.441- 451

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۵۱-۴۴۱

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

Full Research Paper

Quantitative evaluation of amino acids and fatty acids profiles of biosilage produced from chicken waste

Reza Safari[1*], Seyed Vali Hosseini[2], Sharareh Firouzkandian[1], Soheyl Reyhani Poul[3], Mona Kazemi[4]

Received: 2021.06.27
Revised: 2021.10.08
Accepted: 2021.11.13
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Safari, R., Hosseini, V., Firouzkandian, Sh., Reyhani Poul, S., Kazemi, M. (2022). Quantitative evaluation of amino acids and fatty acids profiles of biosilage produced from chicken waste. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 441-451.

Abstract

Introduction: One way to turn chicken waste into high value-added product is to produce fermented silage (biosilage). This product is superior to fish powder due to its characteristics such as high quality protein, probiotic bacteria and low price and can be considered as a suitable alternative for feed industry. Silage can be produced from protein wastes by both acidic and biological methods. The acidic method of producing silage (acidic silage) uses a variety of organic and inorganic acids such as formic acid and sulfuric acid. In the production of biological silage, two methods of autolysis (using internal enzymes) and fermentation (using microbial starters) are used. Starters used for inoculation are mainly from the group of lactic acid bacteria. To produce silage, protein wastes are used, especially fish wastes. Since poultry waste has not been used for biosilage production in the country so far, the aim of the present study is to produce biological silage from chicken waste and evaluate the profile of amino acids and fatty acids in the biosilage.

Materials and methods: Chicken intestine was prepared from meat production complex in Golestan province, Kordkoy city and also Simin Naz poultry industrial slaughterhouse in Sari and was transferred to the processing pilot of Caspian Sea Ecology Research Institute in the shortest time in cold container. During the biosilage production process, protein-degrading bacteria (containing protease enzymes such as gram-positive sporulated bacteria) and acid-producing bacteria (to reduce the pH of the suspension and accelerate the fermentation process, such as lactic acid bacteria) were used as initiator bacteria or microbial starters for intestinal digestion. The product was analyzed for protein, fat, moisture and ash according to standard methods. In this study, high performance liquid chromatography (HPLC) of Cecil model (Seri 200) was used for amino acids analysis. Samples were prepared for assaying amino acids profile in two stages including hydrolysis and derivatization and the results were expressed in grams per 100 grams of substrate. To determine the fatty acids composition of the biosilage sample, the fat was first extracted. In order to evaluate the profile of fatty acids, a Shimadzu model gas chromatography device was used and the results were expressed as a percentage.

Results and discussion: The product produced contained about 60% protein and 21% fat. According to the results, the total of essential amino acids in the produced biosilage was 24.416, the total of non-essential amino acids was

1. Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization, Sari, Iran
2. Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan, Iran.
4. General Department of Fisheries of Mazandaran Province, Babolsar, Iran
(*Corresponding Author Email: safari1351@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71188.1067

30.959 and the total of essential and non-essential amino acids was 55.375 g per 100 g of substrate. Among essential amino acids, the highest amount belonged to the amino acids leucine (7.334±0.45 g/100g) and valine (4.71±0.27 g/100g) and among non-essential amino acids, the highest amount belonged to glutamic acid (10.6±0.73 g/100g) and alanine (5.864±0.81 g/100g). It was also found that all essential amino acids except tryptophan are present in biosilage. Evaluation of biosilage fatty acids profile revealed that the total amount of saturated fatty acids (SFA) was 33.57%, monounsaturated fatty acids (MUFA) was 41.17% and polyunsaturated fatty acids (PUFA) was 24.36%. It was further found that in biosilage the total omega 3 was 2.07%, the total omega 6 was 22.91% and the sum of EPA and DHA was 2.06%.

The profile of amino acids and fatty acids in the biosilage produced from chicken waste is almost the same as that of other products made from protein waste (such as fish meal, fish waste biosilage and hydrolyzed protein powder). This property, along with cheap production and high nutritional value, allows the use of biosilage obtained from chicken waste in the livestock, poultry and aquatics feed industry.

Keywords: Chicken waste, Biosilage, Amino acids profile, Fatty acids profile, Fish powder.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 441- 451

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۵۱-۴۴۱

مقاله علمی-پژوهشی

سنجش کمی ترکیب اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب سیلاژ بیولوژیک تولیدشده از ضایعات مرغ

رضا صفری[۱*]- سیدولی حسینی[۲]- شراره فیروزکندیان[۱]- سهیل ریحانی پول[۳]- مونا کاظمی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۷/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

چکیده

یکی از راه‌های تبدیل ضایعات مرغ به محصولی با ارزش افزاوده بالا، تولید سیلاژ بر پایه تخمیر است (بیوسیلاژ). این محصول به دلیل دارابودن ویژگی‌هایی مانند میزان پروتئین بالا و با کیفیت، باکتری‌های پروبیوتیک و قیمت پائین نسبت به پودر ماهی ارحجیت دارد و می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای آن مطرح باشد. هدف از مطالعه حاضر در مرحله اول تولید بیوسیلاژ از ضایعات مرغ و در مرحله بعد بررسی پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول بود. مطابق یافته‌ها، در بیوسیلاژ تولیدشده، مجموع اسیدهای آمینه ضروری، ۲۴/۴۱۶، مجموع اسیدهای آمینه غیرضروری، ۳۰/۹۵۹ و مجموع اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری، ۵۵/۳۷۵ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا بوده است. همچنین مشخص شد که تمامی اسیدهای آمینه ضروری به غیر از تریپتوفان در بیوسیلاژ وجود دارند. بررسی پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژ نشان داد که در این محصول مجموع اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اسیدهای چرب تک‌زنجیره غیراشباع (MUFA) و اسیدهای چرب چندزنجیره غیراشباع (PUFA) به‌ترتیب ۳۳/۵۷، ۴۱/۱۷، ۲۴/۳۶ درصد می‌باشند. ضمن اینکه در محصول تولیدشده مجموع امگا۳، ۲/۰۷ درصد، مجموع امگا۶، ۲۲/۹۱ درصد و مجموع EPA و DHA، ۲/۰۶ درصد است. از مقایسه پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر و سایر محصولات مشابه (مانند پودر ماهی، روغن ضایعات ماهی و مرغ، پروتئین‌های آبکافتی حاصل از ضایعات) مشخص شد که بیوسیلاژ از ارزش غذایی کافی جهت استفاده در صنعت تغذیه آبزیان، دام و طیور برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: ضایعات مرغ، بیوسیلاژ، پروفیل اسیدهای آمینه، پروفیل اسیدهای چرب، پودر ماهی

مقدمه

اصطلاح سیلاژ یا شیرابه سیلویی به فرآورده یا محصولی گفته می‌شود که در نتیجه تخمیر یا هیدرولیز موادی با ماهیت پروتئینی و یا کربوهیدراتی تولید می‌شود. تولید سیلاژ از تخمیر ساقه و برگ علوفه‌هایی همچون ذرت، جو یا دیگر اضافه‌های مزرعه فرآوری، از قدیم انجام می‌شود و خوراک ویژه برای دام می باشد. با تولید سیلاژ، علوفه به مدت طولانی‌تری نگهداری شده و حاوی مواد سودمند و انرژی زا برای تقویت دام است (Palkar et al., Perez, 2018, 2018). سیلاژ با دو روش اسیدی و بیولوژیک از ضایعات پروتئینی قابل تولید است. در روش اسیدی تولید سیلاژ (سیلاژ اسیدی) از انواع اسیدهای آلی و معدنی مانند اسید فرمیک و اسید سولفوریک استفاده می‌شود. در تولید سیلاژ بیولوژیک از دو روش اتولیز (با استفاده از آنزیم‌های داخلی) و تخمیر (با استفاده از استارترهای میکروبی) استفاده می‌گردد. استارترهای مورد استفاده جهت تلقیح عمدتا از گروه باکتری‌های لاکتیکی می‌باشند (Palkar et al., Perez, 2018, 2018).

یکی از روش‌های تولید سیلاژ استفاده از باکتری‌های تولیدکننده آنزیم‌های پروتئاز به‌عنوان استارتر می‌باشد. برای تولید بیوسیلاژ نیاز به منابع کربوهیدرات (ملاس، آرد، نشاسته) است. در واقع باکتری‌های تجزیه‌کننده، از پروتئین امعاء و احشاء (ضایعات)، به‌عنوان منبع نیتروژن و از منابع کربنی به‌عنوان کربوهیدرات استفاده کرده و باعث تبدیل ماده جامد به یک مایع هیدرولیزشده می‌شوند. به دلیل pH اسیدی محصول تولیدشده، زمان ماندگاری آن بالا بوده و تحت تأثیر

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.
۲- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست، گرگان، ایران.
۴- اداره کل شیلات استان مازندران، بابلسر، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: safari1351@gmail.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71188.1067

آلودگی‌های ثانویه قرار نمی‌گیرد. محصول تولیدشده به‌واسطه پروتئین قابل هضم بالا و پروفیل اسیدهای آمینه کافی، قابلیت استفاده در فرمولاسیون جیره آبزیان را دارا بوده و می‌توان از آن به‌عنوان جایگزین نسبی و یا کامل پودر ماهی استفاده نمود. گران‌ترین ماده مورد استفاده در جیره آبزیان، پودر ماهی است و در نتیجه پس از جایگزین نمودن پودر ماهی با بیوسیلاژ، قیمت تمام‌شده جیره غذایی تهیه‌شده به‌طورچشمگیری کاهش می‌یابد (Palkar et al., 2018, Perez, 2018). بنابراین عمده‌ترین مزایای بیوسیلاژ در مقایسه با پودر ماهی شامل موارد ذیل می‌باشد.

۱. قابلیت هضم پروتئین: آزمایشات نشان داده که پروتئین قابل هضم در بیوسیلاژ ماهی و طیور بین ۸۹- ۸۵ درصد و در پودر ماهی ۶۸ درصد می‌باشد (Safari et al., 2019).

۲. درصد پروتئین خام: بیوسیلاژ تولید شده عمدتاً دارای پروتئین خام بالاتری (۶۶ درصد) در مقایسه با پودر ماهی (۵۳/۶۱- ۶۸/۸۲ درصد) می باشد (Janbakhsh et al., 2018). محاسبه پروتئین خام در محصولات مختلف بر پایه نیتروژن می‌باشد. متأسفانه برخی از شرکت‌های تولیدکننده خوراک آبزیان، از مواد نامتعارف نظیر پودر پر و یا اوره به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کنند. بنابراین در محصول نهایی، علاوه بر درصد پروتئین خام، تعیین پروفیل اسیدهای‌آمینه و قابلیت هضم پروتئین از فاکتورهای کلیدی بوده که کیفیت جیره را مشخص می‌کنند.

۳. محصول دارای پروبیوتیک: به‌واسطه استفاده از باکتری های مفید در فرآیند تولید بیوسیلاژ، محصول تولید شده غنی از باکتری‌هایی نظیر گروه لاکتیک، باسیلوس‌ها و مخمرها است و در حقیقت نیازی به هزینه بیشتر جهت غنی‌سازی محصول با پروبیوتیک‌های دیگر نمی‌باشد.

۴. تکنولوژی تولید: خط تولید پودر ماهی بسیار پیچیده و هزینه خرید و نگهداری تجهیزات مورد استفاده بسیار بالا است. ضمن اینکه راه‌اندازی این خط تولید نیازمند سرمایه‌گذاری کلان می‌باشد. در صورتی که خط تولید بیوسیلاژ بسیار ساده‌تر بوده و با حداقل سرمایه می‌توان اقدام به تولید محصولی با ارزش افزوده بالا نمود (Safari et al., 2019).

جهت تولید سیلاژ از ضایعات پروتئینی به‌خصوص ضایعات آبزیان استفاده می‌شود. از آنجا که در داخل کشور تاکنون از ضایعات طیور جهت تولید بیوسیلاژ بهره‌گیری نشده است، لذا هدف تحقیق حاضر تولید سیلاژ بیولوژیک از ضایعات مرغ و ارزیابی پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول است. میزان ضایعات غیرقابل استفاده مرغ پس از کشتار، معادل ۱۶/۵ درصد است و پیش‌بینی ضایعات تولید شده با توجه به تعداد کشتارگاه‌های طیور در سطح کشور، معادل چندین هزار تن در روز خواهد بود. با بهره‌گیری از روش‌های زیست فناوری می‌توان ضایعات طیور را به محصولاتی با ارزش افزوده بالا مانند بیوسیلاژ تبدیل و در صنعت آبزی‌پروری به عنوان جایگزینی مناسب برای پودر ماهی استفاده نمود. لذا در این تحقیق برای نخستین بار بیوسیلاژ از روده مرغ تولید و پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول نهایی ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

تولید بیوسیلاژ

برای انجام کار در مقیاس پایلوت نیاز به تولید اولیه بیوسیلاژ در مقیاس آزمایشگاهی بود تا پس از انجام آزمون و خطا و اتخاذ بهترین روش، جهت تهیه و آماده‌سازی امکانات و تجهیزات اولیه در مقیاس پایلوت اقدام شود. بدین منظور روده مرغ از مجتمع تولید گوشت در استان گلستان، شهرستان کردکوی و همچنین کشتارگاه صنعتی طیور سیمین ناز ساری تهیه و در مجاورت زنجیره سرد و در کوتاه‌ترین زمان به پایلوت فرآوری پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از انجمادزدایی، نمونه‌ها چرخ و به فرمانتور یک تنی استیل انتقال داده شد. در مرحله بعد پس از غیرفعال‌کردن آنزیم‌های داخلی و همچنین باکتری‌های بیماری‌زای احتمالی (*سالمونلا تیفی موریوم*[1] و *اشریشیا کلی*[2]) با استفاده از تیمار حرارتی (۷۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه)، دمای فرمانتور به دمای محیط کاهش داده شد تا شرایط ثابت گردد. سپس از باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین (*باسیلوس سوبتیلیس*[3] و *باسیلوس لیکنوفورمیس*[4]) و باکتری‌های تولیدکننده اسید (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[5]، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*[6]، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[7]، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی*[8]، *لاکتوباسیلوس کازئیی*[9]) به‌منظور کاهش pH سوسپانسیون و تسریع‌نمودن فرآیند تخمیر تحت عنوان باکتری‌های آغازگر یا استارترهای میکروبی جهت هضم روده استفاده شد. میزان تلقیح باکتری‌ها به صورت مخلوط و در لوگ ۸ به میزان ۵ درصد ماده اولیه بوده است. لازم به ذکر است که باکتری‌های مورد استفاده انحصاری بوده و دارای ویژگی‌هایی نظیر رشد در pH اسیدی، توانایی رشد در

1 *Salmonella typhimurium*
2 *Escherichia coli*
3 *Bacillus subtilis*
4 *Bacillus licheniformis*
5 *Lactobacillus plantarum*
6 *Lactobacillus bulgaricus*
7 *Lactobacillus rhamnosu*
8 *Pediococcus acidilactici*
9 *Lactobacillus casei*

دمای ۷۰ درجه تا ۶ ساعت و همچنین خواص پروتئازی بالا می‌باشند. به هنگام اضافه‌نمودن استارترهای میکروبی، منبع کربوهیدرات (ملاس نیشکر) به‌طور توأمان نیز اضافه گردید (به مقدار ۱۰ درصد ماده اولیه). در مرحله نهایی، دمای فرمانتور در محدوده ۴۵- ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در این شرایط قرار گرفتند. در طی انجام فرآیند، همزن فرمانتور در فواصل زمانی معین فعال و نمونه‌ها کاملا هموژن شدند. پس از اتمام فرآیند، نمونه‌ها از دستگاه جداکننده یا سپراتور عبور داده شدند تا روغن موجود در نمونه جدا گردد. این امر باعث می‌گردد که نمونه‌ها بهتر خشک شده و زمان ماندگاری آن نیز افزایش یابد (درصد روغن جداشده با استفاده از دستگاه سپراتور بین ۱۲- ۱۰ درصد بود). بعد از جدا کردن روغن از نمونه اصلی حاوی پروتئین تجزیه شده، با اضافه نمودن کنجاله کنجد (۳ درصد)، مقدار ماده خشک در نمونه‌های تخمیرشده را افزایش داده تا در نهایت خشک‌کردن محصول با کیفیت بهتری انجام گیرد. نمونه‌ها با استفاده از خشک‌کن صنعتی و در دمای۶۰- ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸- ۶ ساعت خشک شدند. در مرحله نهایی، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه آسیاب به مش‌های یکسان تبدیل و بسته‌بندی و در مکان خشک و خنک نگهداری شدند.

ترکیب شیمیایی محصول

پروتئین خام

برای اندازه‌گیری پروتئین خام، ۱ گرم نمونه و ۸ گرم کاتالیزور پروتئین (شامل ۱۰۰ گرم سولفات سدیم یا پتاسیم و ۱۰ گرم سولفات مس و ۱ گرم پودر سلنیوم) و ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ را داخل بالن هضم کجلدال ریخته و بالن روی حرارت قرار داده شد. در انتها مایع بی‌رنگی در ته بالن ماند. عمل هضم زیر محوطه سرپوشیده مجهز به ونتیلاتور انجام شد چرا که بخارات متصاعد شده از بالن هضم سوزاننده است. مرحله بعدی تقطیر ماده هضم شده بود که به بالن حاوی نمونه هضم، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و سود ۵۰ درصد اضافه گردید و روی حرارت قرار داده شد. چون واکنش گرمازا است، قسمت‌های اتصال دستگاه کنترل شد تا از خروج گازهای متصاعد شده به خارج جلوگیری گردد. سپس۵۰ میلی‌لیتر اسیدبوریک و چند قطره معرف متیل‌رد را داخل یک ارلن ریخته و در زیر رفریژران محل تقطیر قرارداده شد؛ به‌طوری که انتهای لوله متصل به رفریژران در حدود ۲ میلی‌لیتر در محلول اسیدی غوطه‌ور گردد. میزان نیتروژن آزاد در ارلن جمع شده و وارد محلول اسیدی ۰/۱ نرمال شد. در مرحله بعد، این عمل آنقدر ادامه یافت تا هیچگونه تغییر رنگی در لوله مشاهده نشد. در پایان محتوای ارلن توسط اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد (National standard of Iran with number 924, 1993 ; AOAC, 2005). میزان پروتئین خام از رابطه زیر به‌دست آمد:

(۱) درصد نیتروژن = (حجم اسید مصرفی برای نمونه× اسید نرمالیته ×۱۴ ×۱۰۰)/ (گرم نمونه خشک) ×۱۰۰۰

(۲) درصد پروتئین خام= درصد نیتروژن× ۶/۲۵ (فاکتور پروتئین)

خاکستر

۵ گرم از نمونه به داخل کروزه منتقل و سپس بر روی شعله حرارت داده شد. حرارت‌دادن تا عدم تصاعد دود از کروزه ادامه داشت. کروزه‌ها در داخل کوره و در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت حرارت داده شدند. با ظاهرشدن خاکستر سفید، نمونه‌ها از کوره خارج و برای سردشدن در داخل دسیکاتور قرار داده شدند و سپس وزن آن‌ها مشخص گردید (National standard of Iran with number 744, 2002 ; AOAC, 2005). درصد خاکستر با فرمول ذیل محاسبه گردید.

(۳) درصد خاکستر= (وزن خاکستر/ وزن نمونه خشک) × ۱۰۰

رطوبت

پتری‌های حاوی نمونه (۱۰ گرم) به مدت ۶ ساعت در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جهت سردشدن به دسیکاتور منتقل و در نهایت وزن آن‌ها ثبت گردید (National standard of Iran with number 745, 1971 ; AOAC, 2005). برای محاسبه میزان رطوبت نمونه از رابطه زیر استفاده شد. در این رابطه m_1 وزن ظرف و نمونه قبل از خشک‌کردن، m_2 وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن و m_0 وزن نمونه است.

(۴) درصد رطوبت $=[(m_1- m_2)/m_0] \times ۱۰۰$

چربی

مقدار ۲۰ گرم از نمونه به داخل دکانتور ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۱۶۰ میلی‌لیتر متانول و به همین میزان کلروفرم به دکانتور اضافه گردید. با اضافه‌کردن آب مقطر به مجموعه، فازها از یکدیگر جدا شدند. نسبت متانول، کلروفرم و آب ۲: ۲: ۱/۶ بود. سپس لایه کلروفرمی محتوی چربی به‌وسیله دستگاه روتاری خارج گردید. با خروج حلال و توزین مجدد بالن، مقدار چربی نمونه بر حسب درصد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (National standard of Iran with number 742, 2001 ; AOAC, 2005).

(۵) درصد چربی = (وزن نمونه چربی/ وزن اولیه) ×۱۰۰

سنجش پروفیل اسیدهای آمینه

جهت آنالیز اسیدهای آمینه، نمونه‌ها پس از دیفراست به خوبی مخلوط و یکنواخت شدند. در این مطالعه برای آنالیز اسیدهای آمینه از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC، Cecil ، انگلیس) استفاده و آماده‌سازی نمونه‌ها در دو مرحله انجام شد.

مرحله اول: هیدرولیز نمونه برای به‌دست آوردن آمینواسیدهای آزاد؛ ۰/۵ گرم از نمونه بیوسیلاژ به همراه ۰/۲۵ میلی‌لیتر از محلول نورولوسین به لوله‌های هیدرولیز اضافه شدند. مقدار ۲۴ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۶ نرمال به لوله‌های حاوی نمونه اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه مجاور گاز نیتروژن قرار گرفتند و بلافاصله درپوش آن ها گذاشته شد. لوله‌ها به آرامی ورتکس و سپس لوله‌های درپوش‌دار در آون با دمای ۱۱۲ تا ۱۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت برای هیدرولیز قرار داده شدند. پس از پایان عمل هیدورلیز، لوله‌ها در دمای محیط قرار گرفتند تا سرد شوند. نمونه‌های موجود به سیلندر ۵۰ سی‌سی منتقل و با آب دارای درجه خلوص ویژه HPLC به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. در انتها، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه‌شده، صاف شد و با استفاده از آون متصل به پمپ خلاء به آرامی خشک گردید.

مرحله دوم: مرحله مشتق‌سازی؛ به هر لوله حاوی نمونه، ۲۰ میکرولیتر از محلول مشتق‌سازی که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب با درجه خلوص ویژه HPLC است، ۱۰۰ میکرولیتر تری اتیل آمین، ۷۰۰ میکرولیتر متانول و ۱۰۰ میکرولیتر فنیل ایزوتیوسیانات اضافه شد. لوله‌ها به آرامی ورتکس و به مدت ۲۰ دقیقه در جای ثابت (دمای اتاق) قرار داده شدند تا به‌خوبی واکنش مشتق‌سازی انجام شود. در انتهای آزمایش در این مرحله، نمونه‌ها و استاندارد در آون متصل به پمپ خلا به آرامی خشک شدند. برای قرائت با دستگاه، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر رقیق‌کننده، به لوله حاوی استاندارد و لوله‌های حاوی نمونه افزوده و به آرامی ورتکس شدند. در مرحله بعد، برای لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ انجام شد. در انتها از مایع رویی (سوپرناتانت) لوله‌ها به مقدار ۲۰ میکرولیتر جدا و به دستگاه HPLC با مشخصات جدول ۱ تزریق شد (Moore, 2004).

جدول ۱- مشخصات دستگاه HPLC جهت آنالیز کمی و کیفی اسیدهای آمینه

Table 1- Specifications of HPLC device for quantitative and qualitative analysis of amino acids

Device name	HPLC (Cecil)
Pump	Cecil: Seri 200
Detector	Knauer
Column	C18 (15cm × 4.6 mm) –Phenomenex
The wavelength used	238 nm
Solvent passage speed	1 ml/min
Solvent composition	Acetate buffer + Hexansulfonate + CU acetate
Analysis method	Isocratic
The software used	CHRUMuLan

سنجش پروفیل اسید چرب

جهت تعیین ترکیب اسیدهای چرب در نمونه بیوسیلاژ، ابتدا چربی نمونه استخراج شد. بدین ترتیب که ابتدا ۱ گرم نمونه به بالون ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و سپس ۵ میلی‌لیتر متانول به نمونه افزوده و به شدت تکان داده شد. سپس۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه و مجددا بالن ژوژه به شدت تکان داده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید تا چربی بافت کاملاً خارج شود. در مرحله بعد، نمونه‌ها به دکانتور منتقل و به آن ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و بعد از یک ساعت سه فاز مجزا در داخل دکانتور تشکیل شد. فاز چربی و حلال که در قسمت زیرین دکانتور وجود داشت با استفاده از قیف و کاغذ صافی جدا و به ظرف مخصوص منتقل و به کمک نیتروژن حلال‌پرانی شد که در نهایت چربی باقی ماند. جهت استری-کردن چربی از روش ISO 5509 (2000) استفاده شد. ۵ میلی‌لیتر سود متانولی ۲ درصد به چربی استخراج‌شده اضافه گردید. سپس درب ظرف بسته و به شدت تکان داده شد. ظرف حاوی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت و پس از خنک شدن، ۲/۲ میلی‌لیتر محلول BF_3 (تری فلورایدبور) به ترکیب اضافه و سپس ۳ دقیقه مجددا در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن، به ترکیب فوق، ۱ میلی‌لیتر ان-هگزان نرمال اضافه گردید. به این محلول (بعد از تکان دادن)، ۱ میلی‌لیتر محلول نمک اشباع (۳۰۰ گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر) نیز اضافه شد. ترکیب فوق به شدت تکان داده شد و تا زمان تشکیل دو فاز مختلف، ظرف حاوی نمونه در محلی خاص قرار گرفت. فاز بالایی با دقت جدا و برای بررسی و شناسایی اسیدهای چرب موجود در نمونه از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC، Shimadzu، ژاپن) با مشخصات جدول ۲ استفاده شد.

پس از تهیه متیل استر اسیدهای چرب، حدود ۱ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مکان هر یک از اسیدهای چرب براساس زمان بازداری آن¬ها در نمونه استاندارد شناسایی و به صورت گرم در ۱۰۰ گرم چربی نمونه بیان گردید (ISO 5509, 2000).

جدول ۲- مشخصات دستگاه GC جهت آنالیز کمی و کیفی اسیدهای چرب

Table 2- Specifications of GC device for quantitative and qualitative analysis of fatty acids

Device name	GC (Shimadzu)
Column temperature	191°C
Injection temperature	215°C
Detector temperature	320°C
Detector type	(F.I.D.) Flame Ionization Detector
Column type	BPX70
Carrier gas	Nitrogen
Flow intensity	0.6 ml/min

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی بیوسیلاژ تولید شده

در جدول ۳ ترکیب شیمیایی بیوسیلاژ تولیدشده ارائه شده است. این محصول دارای حدود ۶۰ درصد پروتئین و ۲۱ درصد چربی می باشد. بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات ماهی قزل‌آلا دارای ۵۲/۸ درصد پروتئین و ۸/۵۲ درصد چربی بود (Safari et al., 2019). میزان پروتئین، چربی و خاکستر در بیوسیلاژ بسته به شرایط تولید و نوع سوبسترا می‌تواند متفاوت باشد. میزان پروتئین و چربی در پودر ماهی آنچوی ۷۴/۶۹ و ۸/۶۱ درصد اندازه‌گیری شد (Turan et al., 2007). میزان پروتئین در پودر ماهی آنچوی بیشتر از بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر بود اما سطح چربی این پودر از بیوسیلاژ کمتر است.

جدول ۳- ترکیب شیمیایی بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ

Table 3- Chemical composition of biosilage produced from poultry waste

Chemical composition	Amounts
Protein	59.09 ±0.49
Fat	21.3 ±0.45
Moisture	9.32 ±0.61
Ash	6.17 ±0.17

پروفیل اسیدهای آمینه

نتایج پروفیل اسیدهای آمینه بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که تمامی اسیدهای آمینه ضروری به غیر از تریپتوفان در بیوسیلاژ وجود دارند. مطابق نتایج، در بیوسیلاژ تولید شده، مجموع اسیدهای آمینه ضروری، ۲۴/۴۱۶، مجموع اسیدهای آمینه غیرضروری، ۳۰/۹۵۹ و مجموع اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری، ۵۵/۳۷۵ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا می‌باشد. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، در بین اسیدهای آمینه ضروری بالاترین مقدار متعلق به اسید آمینه لوسین (۰/۴۵± ۷/۳۳۴ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و والین (۰/۲۷± ۴/۷۱ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و در بین اسیدهای آمینه غیرضروری بالاترین مقدار مربوط به گلوتامیک‌اسید (۰/۷۳± ۱۰/۶ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و آلانین (۰/۸۱± ۵/۸۶۴ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) بوده است. مجموع اسیدهای آمینه ضروری بیوسیلاژ تولیدشده از ماهی *Merluccius hubbsi* ۲۷/۱ گرم در ۱۰۰ گرم بود که کمی بیشتر از این مقدار در بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر است (Fernández Herrero et al., 2015). مقادیر و نوع اسیدهای آمینه در محصول تولید شده، با پودر ماهی مقایسه شد (Janbakhsh et al., 2018). نتایج نشان داد که نسبت اسیدهای آمینه ضروری به اسیدهای آمینه غیرضروری هر دو محصول نزدیک به هم (تقریبا برابر) است و از این نظر تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در تحقیق Janbakhsh و همکاران (۲۰۱۸) نسبت E/NE (ضروری به غیرضروری) پودر ماهی، ۰/۷۸۴ بود که این مقدار برای بیوسیلاژ ضایعات مرغ نیز ۰/۷۸۸ ثبت گردید (برابر) (Janbakhsh et al., 2018). در مطالعه Vidotti و همکاران (۲۰۰۳) پروفیل اسیدهای آمینه در سیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهیان آب شور، آب شیرین و تیلاپیا که به روش‌های اسیدی و بیولوژیک تولید شدند بررسی شد (Vidotti et al., 2003). نتایج حاکی از آن است که مقادیر اسیدهای

آمینه و مجموع پروتئین موجود در بیوسیلاژ مطالعه مذکور در بیشتر موارد کمتر از بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ در تحقیق حاضر می‌باشد. اگر روش مورد استفاده که همان روش تخمیر با استفاده از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد را در نظر بگیریم، بیوسیلاژ تخمیری حاصل از ضایعات ماهیان آب شور شبیه به بیوسیلاژ تولید شده در مطالعه حاضر بوده است. به عبارت دیگر، درصد پروتئین و همچنین پروفیل برخی از اسیدهای آمینه در این دو بیوسیلاژ نزدیک به هم می‌باشد (آرژینین، والین و لوسین). در مطالعه Sarhadi و همکاران (۲۰۱۲)، پروفیل اسیدهای آمینه در استخوان سه ماهی کیلکای آنچوی (*C. engrauliformis*)، ساردین پهلو طلایی (*S. gibossa*) و موتوماهی (*S. indicus*) بررسی شد. میزان اسیدهای آمینه ضروری در استخوان این سه ماهی به‌ترتیب ۳۷/۹۵، ۳۸/۲ و ۳۶/۶۷ درصد بود که این مقادیر بیشتر از اسیدهای آمینه ضروری در بیوسیلاژ تهیه‌شده از ضایعات مرغ (۲۴/۴۱۶ درصد) در تحقیق حاضر است (Sarhadi et al., 2012). همچنین مقادیر اسیدهای آمینه غیرضروری و متعاقبا اسیدهای آمینه کل در استخوان سه ماهی مذکور بیشتر از بیوسیلاژ ضایعات مرغ بود. نتیجه پژوهش Taheri و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که مجموع اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری در پروتئین آبکافتی ضایعات کشتارگاهی مرغ به‌ترتیب ۴۲/۴۱ و ۲۹/۸۸ گرم در ۱۰۰ گرم است. اگرچه بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر از نظر میزان اسیدهای آمینه غیرضروری با پروتئین آبکافتی تولیدشده در مطالعه مذکور (Taheri et al., 2012) تقریبا برابر است اما دارای میزان اسیدهای آمینه ضروری کمتری می‌باشد.

جدول ٤- ترکیب اسیدهای آمینه در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ

Table 4- Amino acids composition (profile) in biosilage produced from poultry waste

Amino acids type	Amounts (g/100g substrate)
Histidine	0.773± 0.02
Arginine	3.613± 0.12
Threonine	1.085± 0.05
Valine	4.71± 0.27
Methionine	0.303± 0.01
Isoleucine	3.332± 0.23
Leucine	7.334± 0.45
Phenylalanine	1.814± 0.04
Lysine	1.452± 0.071
Tryptophan	0
Total essential amino acids	24.416
Aspartic acid	2.91± 0.16
Glutamic acid	10.6± 0.73
Serine	2.711± 0.47
Glycine	4.093± 0.21
Alanine	5.864± 0.81
Proline	2.938± 0.43
Tyrosine	1.806± 0.27
Cysteine	0.036± 0.008
Total non-essential amino acids	30.959
Total amino acids	55.375
E/NE	0.78

پروفیل اسیدهای چرب

در جدول ۵، نتایج پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ ارائه شده است. مطابق این جدول، در بیوسیلاژ، مجموع اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، ۳۳/۵۷، اسیدهای چرب تک‌زنجیره غیراشباع (MUFA)، ۴۱/۱۷ و اسیدهای چرب چندزنجیره غیراشباع (PUFA)، ۲۴/۳۶ درصد می‌باشد. همچنین در این محصول، مجموع امگا۳، ۲/۰۷ درصد، مجموع امگا۶، ۲۲/۹۱ درصد و نسبت امگا۶ به امگا۳، ۱۱/۰۶ و در نهایت مجموع EPA و DHA، ۲/۰۶ درصد بوده است. پروفیل اسیدهای چرب بیان شده در جدول ۵، در حقیقت پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژی است که روغن آن با استفاده از دستگاه سپراتور به‌طور نسبی جدا شده و درصد روغن در بیوسیلاژ به مراتب کمتر از بیوسیلاژ اولیه می‌باشد. بنابراین طبیعی است که درصد اسیدهای چرب در محصول نهایی اندکی پایین باشد. در مقایسه این مطالعه و سیلاژ تهیه‌شده از ماهی سی‌باس (*Dicentrarchus labrax*) (به روش‌های مختلف بیولوژیک و اسیدی) مشخص گردید که میزان اسیدهای چرب اشباع شده در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ بیشتر از مطالعه Ozyurt و همکاران (۲۰۱۸) است. این در حالیست که درصد اسیدهای چرب غیراشباع تک‌زنجیره و چندزنجیره در دو محصول تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند. در مطالعه‌ای دیگر پروفیل اسیدهای چرب سیلاژ اسیدی و بیولوژیک تولیدشده از ضایعات ماهی با یکدیگر مقایسه شدند (Ozyurt et al., 2016).

جدول ۵- ترکیب اسیدهای چرب در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ

Table 5- Fatty acids composition (profile) in biosilage produced from poultry waste

Fatty acids type	Amounts (%)
C14:0	0
C15:0	0.54± 0.12
C16:0	25.77± 1.36
C18:0	7.26± 0.14
C17:0	0
C20:0	0
SFA	33.57
C16:1	3.65± 0.54
C17:1	0
C18:1(n9)C	37.65± 1.65
MUFA	41.17
C18:2(n6)C	22.18± 0.95
C18:3 n3	0
C20:3 n6	0
C20:4 n6 ARA	0.73± 0.45
C20:5 n3 EPA	0.87± 0.11
C22:5 n3 DPA	0
C22:6 n3 DHA	1.2± 0.021
PUFA	24.36± 1.32
n6/n3	11.06± 0.54
EPA+DHA	2.07± 0.11

نتایج نشان داد مجموع اسیدهای چرب چندزنجیره غیراشباع و نسبت امگا۳ به امگا۶ در سیلاژ بیولوژیک بیشتر از سیلاژ اسیدی است اما در سایر موارد اختلاف چندانی با هم ندارند. مقایسه پروفیل اسیدهای چرب سیلاژ ماهی در مطالعه مذکور با تحقیق حاضر نشان داد که میزان اسیدهای چرب تک‌زنجیره و چندزنجیره غیراشباع بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ بیشتر از سیلاژ بیولوژیک و اسیدی

تولیدشده از ضایعات ماهی می‌باشد. این در حالیست که بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ دارای میزان اسیدهای چرب اشباع کمتری است. در تحقیقی، نسبت امگا۶ به امگا۳ در روغن استخراجی از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار اسیدی و بازی به‌ترتیب ۶/۷۵ و ۵/۸۱ محاسبه شد (Flahatgar et al., 2016) که این ارقام در مقایسه با این نسبت در بیوسیلاژ تهیه شده از ضایعات مرغ کمتر است. مقادیر SFA، MUFA و PUFA در روغن استخراجی از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به روش آنزیمی به‌ترتیب معادل ۳۱/۴، ۳۴ و ۳۴/۴۹ درصد بود (Reyhani Poul et al., 2018). مقایسه این نتایج و یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ مقادیر بالاتری از SFA و MUFA را نسبت به روغن ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد. مجموع EPAو DHA روغن ضایعات قزل‌آلا در پژوهش Reyhani Poul و همکاران (۲۰۱۸)، ۲۰/۳۷ درصد اندازه‌گیری شد که تقریبا ۱۰ برابر این مقدار در بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ (۲/۰۶ درصد) است. نسبت MUFA به PUFA (مقاومت اکسایشی روغن‌ها)، PUFA به SFA (ارزش غذایی روغن‌ها)، امگا۳ به امگا۶ و DHA به EPA در روغن ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به‌ترتیب معادل ۰/۹۸، ۱/۰۹، ۴/۵۴ و ۱/۲۴ بود (Reyhani Poul et al., 2018). این نسبت‌ها در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ به‌ترتیب ۱/۶۹، ۰/۷۲، ۰/۰۹ و ۱/۳۷ می‌باشد. در مطالعه Turan و همکاران (۲۰۰۷)، پروفیل اسیدهای چرب پودر ماهی آنچوی ارزیابی و مشخص شد مقادیر SFA، MUFA و PUFA در این محصول به‌ترتیب ۳۲/۲۴۸، ۲۰/۲۲۸ و ۳۱/۹۸۴ درصد است (Turan et al., 2007). بیوسیلاژ تولید شده در تحقیق حاضر از نظر سطوح SFA و MUFA غنی‌تر است اما مقدار PUFA در آن نسبت به پودر ماهی آنچوی تولیدشده در تحقیق مذکور کمتر می‌باشد. مجموع امگا۳ و امگا۶ در پودر ماهی آنچوی به‌ترتیب ۲۷/۰۳۷ و ۴/۹۴۷ درصد بود. بیوسیلاژ تولید شده در تحقیق حاضر دارای امگا۳ کمتر اما امگا۶ بیشتری نسبت به پودر تولیدشده در پژوهش Turan و همکاران (۲۰۰۷) است. نسبت امگا۶ به امگا۳ در پودر آنچوی ۰/۱۸ بود که رقم کمتری نسبت به بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ (۱۱/۰۶) می‌باشد. روغن تولید شده از پوست مرغ (ضایعات) به روش آنزیمی (فلاورزایم) در مطالعه Fallah Delavar و Farmani (۲۰۱۸) دارای ۱ درصد امگا۳ و ۱۹/۳ درصد امگا۶ بود.

نتیجه‌گیری

پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ تقریبا هم‌سطح سایر فراورده‌هایی است که از ضایعات پروتئینی تولید می‌شوند (مانند پودر ماهی، بیوسیلاژ ضایعات ماهی و پودرهای پروتئین آبکافتی). این ویژگی در کنار تولید ارزان و و ارزش غذایی بالا، امکان استفاده از بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ را در صنعت تغذیه دام، طیور و آبزیان فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

محققین تحقیق حاضر بر خود لازم می‌دانند از اداره کل شیلات استان مازندران و پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. AOAC. (2005). Official method of Analysis. 17th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.
2. Fallah-Delavar, M., and Farmani, J. (2018). Recovery and characterization of enzymatic protein hydrolyzates and Fat from chicken Skin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *95*(9), 1151-1161.
3. Fernández Herrero, A., Vittone, M., and Salomone, A. (2015). Biological silage of *Merluccius hubbsi*. Amino acid composition, degree of hydrolysis and peptides size. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. *3* (6), 57-62.
4. Flahatgar, F., Zakipour Rahimabadi, E., and Rostamzad, H. (2016). Fatty acid profile and oxidation stability of oil extracted from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by-product by isoelectric solubilization/precipitation. *Aquatic Animals Nutrition*, *2* (1), 1-14
5. ISO 5509. (2000). Animal and vegetable fats and oils- Preparation of methyl esters of fatty acids. ISO/TC 34/SC 11. 24 p.
6. Janbakhsh, S., Hosseini Shekarabi, S. P., and Shamsaie Mergan, M. (2018). Nutritional value and heavy metal content of fishmeal from the Southwest Caspian Sea. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, *16*(4), 307-317.
7. Moore, J. (2004). Amino acid analysis of hydrolysates (feed, fxal, etc), Michign State University, Department of Animal Sciences, Nathalie Trottiers Laboratory.
8. National standard of Iran with number 742. (2001). Meat and its products- Fat measurement- Test method. Iran Standard and Industrial Research Institute.

9. National standard of Iran with number 744. (2002). Meat and its products- Ash measurement- Test method. Iran Standard and Industrial Research Institute.
10. National standard of Iran with number 745. (1971). Meat and its products- Moisture measurement. Iran Standard and Industrial Research Institute.
11. National standard of Iran with number 924. (1993). Measurement of total protein in meat and its products. Iran Standard and Industrial Research Institute.
12. Özyurt, G., Gökdoğan, S., Şimşek, A., Yuvka, I., Ergüven, M., and Kuley Boga, E. (2016). Fatty acid composition and biogenic amines in acidified and fermented fish silage: a comparison study. *Archives of Animal Nutrition*, *70*(1), 72-86.
13. Özyurt, G., Özkütük, A. S., Uçar, Y., Durmuş, M., and Özoğul, Y. (2018). Fatty acid composition and oxidative stability of oils recovered from acid silage and bacterial fermentation of fish (Sea bass–*Dicentrarchus labrax*) by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, *53*(5), 1255-1261.
14. Palkar, N. D., Koli, J. M., Gund, D. P., Patange, S. B., Shrangdher, S. T., Sadawarte, R. K., and Akhade, A. R. (2018). Preparation of co-dried fish silage by using fish market waste and its comparative study. *International Journal* of *Pure and Applied Bioscience*, *6*(2), 1567-1577.
15. Perez, R. 2018. Fish silage for feeding livestock. FAO Fishery Report No. 560. Rome, FAO. 86.
16. Reyhani Poul, S., Jafarpour, A., and Safari, R. (2018). Evaluation of oil fatty acid profile, functional properties and antioxidants activity of hydrolyzate produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by application of protamex and neutrase enzymes. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *14* (1), 162-176.
17. Safari, (2019). Production of biosilage from rainbow trout waste. Final report. Caspian Sea Ecological Research Center.
18. Sarhadi, N., Motamedzadegan, A., Taheri, A., and Azad, M. (2012). Comparison study of the proximate composition and amino acid profile in the bones of Goldstripe sardine (*Sardinella gibossa*), Anchovy kilka (*Clupeonella engrauliformis*) and Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *21* (1), 101-112
19. Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., and Habibi Rezaie, M. (2012). Process optimization of poultry by-products hydrolysate production by RSM. *Iranian Journal of Food Science and Industry*, *34* (9), 65-76
20. Turan, H., Kaya, Y., and Erkoyuncu, İ. (2007). Protein and lipid content and fatty acid composition of anchovy meal produced in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *31*(2), 113-117.
21. Vidotti, R. M., Viegas, E. M. M., and Carneiro, D. J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*, *105*(1-4), 199-204. https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00056-7

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 453- 466

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۶۶-۴۵۳

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

Full Research Paper

Investigation of physical and mechanical properties of biodegradable opopanax gum film containing resin and nanoparticles of opopanax

Narges Akafian[1], Hajar Shekarchizadeh[2*]

Received: 2021.09.01
Revised: 2021.11.12
Accepted: 2021.11.16
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Akafian, N., Shekarchizadeh, H. (2022). Investigation of physical and mechanical properties of biodegradable opopanax gum film containing resin and nanoparticles of opopanax. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 453-466.

Abstract

Introduction: In the last decade, nanotechnology approaches have been used to improve the functional properties of packaging materials. The main focus is on creating new packaging materials that extend the shelf life of food, which in turn improves food safety performance. The use of nanostructures can also improve the mechanical properties of the packaging. Many traditional packages are made from non-degradable materials that double the environmental pollution in addition to using fossil fuels to produce them. Resin is a natural or synthetic compound that is very viscous and hardens under certain conditions. It is usually soluble in alcohol r. Natural resin is obtained from plants. This material is very sticky but hardens over time. Due to environmental concerns and the possibility of depletion of oil reserves, the construction of composites based on natural resins from renewable sources has become important. In previous studies, Javashir gum has been used to prepare an edible film with high water vapor permeability and solubility, as well as poor physical properties. Since Javashir gum is a natural, native and inexpensive gum, so in this research, the improvement of the properties of the film prepared from Javoshir gum is considered using.a combination of nanoparticles and resin obtained from Javoshir gum

Materials and methods: Javshir nanoparticles were sprayed on Javashir film (4% gum and 2.5% glycerol) at two different times of 30 and 60 minutes. In order to increase the hydrophobicity of the films, Javashir resin was covered as a layer on the surface of the films. Then different physical and mechanical properties of the film such as thickness, water solubility, and water vapor permeability, elongation at break, tensile strength, contact angle and morphology were determined.

Results and discussion: The results of thickness measurement showed that adding large amounts of nanoparticles as well as coating the film surface with resin increased the film thickness. Solubility results showed that all films have a very high solubility due to the hydrophilic nature of Javashir. However, the addition of nanoparticles and coating with resin reduced the water solubility of the film. The water vapor permeability of nano-60 film was increased compared to the control film which can be attributed to the increase in film surface due to the addition of nanoparticles. However, coating the surface with resin significantly reduced the water vapor permeability of the film. The tissue test showed that nano-30 resin film had 6.54 ± 2.72% elongation to tear point and 302.9 ± 47.1% tensile strength. Nano 30 resin film had the highest tensile strength and the lowest tensile percentage. The results of the contact angle showed that the lowest contact angle, which indicates high hydrophilicity, was related to the control sample, and the contact angle increased by

1. M. Sc., Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156–83111, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156–83111, Iran.
(*Corresponding Author Email: shekarchizadeh@iut.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72273.1089

adding nanoparticles and coating with resin, resulting in increased hydrophobicity. SEM images also showed that the addition of nanoparticles and resin coating reduced the film roughness.

Finally, it can be said that the addition of Javoshir nanoparticles could well increase the tensile strength of Javashir film, and coating the surface of the film with resin was very effective in reducing the hydrophilicity and water vapor permeability of Javashir film.

Keyword: Gum, resin, Javashir, edib film, nanoparticles.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 453- 466

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۶۶-۴۵۳

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم زیست تخریب‌پذیر جاوشیر حاوی رزین و نانوذرات جاوشیر

نرگس عکافیان[۱]- هاجر شکرچی‌زاده[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵

چکیده

به‌منظور بهبود خواص فیلم تهیه شده از جاوشیر از نانو ذرات صمغ جاوشیر و همچنین رزین جاوشیر استفاده شد. نانوذرات روی فیلم جاوشیر (۴ درصد صمغ و ۲/۵ درصد گلیسرول) طی زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه پاشش شدند. به‌منظور افزایش آبگریزی فیلم‌ها از رزین جاوشیر استفاده شد که به صورت یک لایه روی سطح فیلم‌ها پوشش داده شد. ضخامت فیلم‌ها پس از خشک شدن افزایش یافت که می‌تواند به دلیل فشار بخار آب به هنگام خروج از فیلم در زمان تبخیر شدن باشد. نتایج حلالیت نشان داد که کلیه فیلم‌ها حلالیت بسیار بالایی دارند که به دلیل ماهیت آبدوست جاوشیر است. البته افزودن نانوذرات و پوشش‌دهی با رزین سبب کاهش حلالیت در آب فیلم‌ها شد. نفوذپذیری به بخار آب فیلم نانو۶۰ نسبت به فیلم شاهد افزایش یافته بود که می‌توان آن را به افزایش سطح فیلم‌ها در اثر افزودن نانوذرات نسبت داد. این در حالی است که پوشش‌دهی سطح با رزین به‌طور معنی‌داری نفوذپذیری به بخار آب فیلم را کاهش داد. آزمون بافت‌سنجی نشان داد که فیلم نانو۳۰+ رزین دارای ۲/۷۲ ±۶/۵۴ درصد کشیدگی تا نقطه پارگی و۴۷/۱ ± ۳۰۲/۹ استحکام کششی بود. فیلم نانو ۳۰+ رزین بیشترین استحکام کششی و کمترین درصد کشیدگی را داشت. نتایج زاویه تماس نشان داد که با افزودن نانوذرات و پوشش‌دهی با رزین زاویه تماس و در نتیجه آبگریزی افزایش یافته است. تصاویر SEM نیز نشان داد که افزودن نانوذرات و پوشش‌دهی با رزین سبب کاهش زبری فیلم شده است. در نهایت می‌توان گفت که افزودن نانوذرات جاوشیر به خوبی توانست استحکام کششی فیلم جاوشیر را افزایش دهد و پوشش‌دهی سطح فیلم با رزین برای کاهش ویژگی‌های آب دوستی و نفوذپذیری به بخار آب فیلم جاوشیر بسیار موثر بود.

واژه‌های کلیدی: صمغ، رزین، جاوشیر، فیلم خوراکی، نانوذرات.

مقدمه

نانوتکنولوژی دستکاری یا خودآرایی تک تک اتم‌ها، مولکول‌ها یا خوشه‌های مولکولی و یا ساختارهایی است که می‌توانند مواد و دستگاه هایی را با خصوصیات جدید به وجود آورند. تجمعی از واحدهای سازنده (اتم و یا مولکول) با اندازه‌ای بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر را نانوذرات می گویند. به‌طور کلی با تغییر اندازه نانوذرات در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر، نسبت سطح به حجم و فاصله ترازهای انرژی تغییر می‌کند. این دو متغیر عامل بسیاری از تغییر خواص و ویژگی‌ها می‌باشند. فناوری نانو در عرصه‌هایی همچون تحویل مواد مغذی به درون بدن توسط حامل های نانو مقیاس، بسته‌بندی موادغذایی و نیز در تجزیه و تحلیل مواد غذایی با استفاده از نانوحسگرها وارد شده است (Khezri, 2018، Kubik et al., 2005).

استفاده از فناوری نانو در محصولات غذایی را می‌توان به دو دسته کلی کاربرد مستقیم و کاربرد غیرمستقیم تقسیم‌بندی نمود (Kadivar and Soltanizadeh, 2013). استفاده مستقیم به تجمع نانومواد در محصولات غذایی اشاره دارد. در حالیکه کاربردهای غیرمسقیم شامل به‌کارگیری نانومواد در بسته‌بندی مواد غذایی است. به دلیل موانعی همچون استانداردها و مقررات مرتبط با تولید مواد غذایی و نیز حساسیت مصرف کننده نسبت به تولید مواد غذایی جدید با استفاده از فناوری نانو، می‌توان انتظار داشت که بیشتر کاربرد نانوتکنولوژی در بخش استفاده غیرمستقیم قرار گیرد. در استفاده غیرمستقیم هیچ نانومادهای به‌طور

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: shekarchizadeh@iut.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72273.1089

مستقیم در ماتریکس غذایی وجود ندارد (Rajaei, 2017; Radbeh, 2017).

در یک دهه اخیر روش های نانوتکنولوژی برای بهبود ویژگی‌های عملکردی مواد بسته‌بندی به‌کار رفته‌اند. تمرکز اصلی بر روی ایجاد مواد بسته‌بندی جدیدی است که عمر مواد غذایی را افزایش می‌دهند که این ناشی از بهبود عملکرد محافظتی از غذا است (Ramehran, 2014). به‌عنوان مثال، وجود تک لایه‌های نفوذناپذیر نانومقیاس در یک ترکیب که پس از یک تغییر شیمیایی به‌دست می‌آید می‌تواند تبادل گاز (اکسیژن، نیتروژن، کربن دی‌اکسید و غیره) با محیط را کاهش دهد. در کنار بهبود عملکرد محافظت از ماده بسته‌بندی شده، استفاده از نانوساختارها می‌تواند ویژگی‌های مکانیکی بسته‌بندی را نیز بهبود دهد. نانوکامپوزیت‌های تشکیل شده از پلیمرهای زیستی توانسته‌اند جایگزین مواد مرسوم برای بسته‌بندی شوند. استفاده از نانوکامپوزیت‌های زیستی برای بسته‌بندی مواد غذایی نه تنها از مواد غذایی محافظت می‌کند و عمر مفید آنها را افزایش می‌دهد بلکه می‌تواند یک راه حل سازگار با محیط زیست در نظر گرفته شود. بسیاری از بسته‌بندی‌های سنتی از مواد غیرقابل تجزیه ساخته شده‌اند که آلودگی محیط زیست را علاوه بر مصرف سوخت‌های فسیلی برای تولید آنها دو چندان می‌کند. استفاده از نانوکامپوزیت‌های زیستی تا حد زیادی نیاز به استفاده از پلاستیک‌ها به‌عنوان مواد بسته‌بندی را کاهش می‌دهد و به پاک‌سازی و بهسازی محیط زیست کمک می‌کند. با این حال، مواد زیست تخریب‌پذیر خواص مکانیکی و ممانعتی ضعیفی دارند که بایستی قبل از آن که جایگزین پلاستیک‌های سنتی شوند، خواص آنها به‌طور قابل توجهی بهبود یابند (Rahimi et al. 2013، Diaz-Visurraga et al., 2010، Li et al., 2014).

گیاه جاوشیر از جمله گیاهان دارویی از راسته Umbellales با نام علمی *Prangos Ferulacea (L.) Lindl* است که بومی نواحی جنوبی ایران بوده و در زبان فارسی به نام جاوشیر و در طب سنتی استان آذربایجان غربی با نام محلی سیابو و به‌عنوان دارویی کاهنده قند خون شناخته می‌شود. از ریشه گیاه در ناحیه یقه با تیغ زدن و خراش و شکاف، شیره‌ای خارج می‌شود که به تدریج در مقابل هوا سفت می‌شود. البته از ساقه گیاه نیز صمغ گرفته می‌شود ولی کیفیت صمغ ریشه بالاتر است. این شیره در واقع صمغ گیاه است که رنگ سطح خارجی آن قرمز تیره است و سطح داخلی آن سفید است. طعم آن تند است و زبان را می‌گزد و بوی نامطبوعی دارد. صمغ ترشح شده از گیاه جاوشیر نوعی صمغ-رزین است که دارای ۶۳/۵ درصد رزین، ۲۷ درصد صمغ و ۹/۵ درصد اسانس است که در طب سنتی در درمان بسیاری از اختلالات مورد استفاده بوده است. این گونه در دامنه‌های البرز و در نواحی جنوبی ایران می‌روید. همچنین جاوشیر در استان کهگیلویه و بویراحمد در کوه دنا به وفور یافت می‌شود. در استان اصفهان نیز شهر فریدون شهر که از سردترین نقاط این استان کویری است، منبع جاوشیر است (Kheradkhord, 2018).

رزین ترکیبی طبیعی یا مصنوعی است که بسیار چسبناک است و تحت شرایطی سخت می‌شود. معمولاً در الکل قابل حل است اما در آب حل نمی‌شود. این ترکیب به طرق گوناگون طبقه‌بندی می‌شود که بستگی به ترکیب شیمیایی و مورد مصرف آن دارد. همچنین کاربردهای زیادی در هنر، تولید پلیمر و غیره دارد (A-Munshi et al., 2008). رزین طبیعی از گیاهان به‌دست می‌آید. این ماده بسیار چسبنده است ولی در اثر گذشت زمان سفت می‌شود. رنگ رزین گیاهی از شفاف تا قهوه‌ای تیره متغیر است و میزان سختی و کدورت آن متفاوت است. به دلیل نگرانی‌های زیست محیطی و امکان پایان ذخایر نفتی، ساخت کامپوزیت‌های بر پایه رزین‌های طبیعی از منابع قابل تجدید، اهمیت یافته است (Hattenhauer et al., 2016, Jada, 1998, Kubik et al., 2005).

در مطالعه‌ای که توسط Salarbashi و همکاران (۲۰۱۶) انجام گرفت، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی فیلم‌های حاوی نانوذرات اکسید تیتانیوم بر پایه پلی‌ساکارید آرد سویا بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات در فیلم‌ها، میزان رطوبت و حلالیت آنها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت اما میزان مقاومت کششی آنها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Salarbashi et al. 2016). در مطالعه دیگر توسط Zhang و Kawakami (۲۰۱۰) آماده‌سازی یک مرحله‌ای نانوذرات کیتوزان با روش الکترواسپری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با بهینه‌سازی محلول و پارامترهای گرانروی و هدایت الکتریکی محلول، با کاهش غلظت استیک اسید، غلظت کیتوزان و یا میزان جریان می‌توان ذرات کوچکتر را به‌دست آورد (Zhang and Kawakami, 2010). در مطالعه‌ای دیگر توسط Liu و همکاران (۲۰۱۸) ساخت فیلم ترکیبی PVA-کیتوزان ضدباکتری با استفاده از روش الکترواسپری برای کاربردهای بسته‌بندی مواد غذایی بررسی شد. نتایج نشان دادکه در مقایسه با فیلم PVA خالص، فیلم CS -PVA افزایش طول بیشتر در هنگام شکست، نفوذپذیری به اکسیژن کم، نفوذپذیری به بخار آب کمتر و فعالیت ضدباکتری بیشتر نشان دادند (Liu et al., 2018).

امروزه به دلیل مشکلات زیست محیطی مواد سنتزی، استفاده از منابع طبیعی و ریست تخریب‌پذیر به‌عنوان مواد بسته‌بندی غذایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برای این منظور استفاده از منابع بومی از بعد اقتصادی اهمیت ویژه‌ای یافته است. لازمه رسیدن به این هدف، انجام مطالعات گسترده بر روی منابع بومی است تا بتوان بر اساس نتایج مطالعات، منابع مناسب برای این هدف را یافته و سپس برنامه‌ریزی

هایی در سطح کلان برای کشت گسترده آن منابع انجام داد. علی‌رغم اینکه جاوشیر گیاهی بومی ایران است و امکان کشت آن در مناطق گسترده‌ای از کشور وجود دارد ولی استفاده از آن به‌عنوان گیاهی دارویی محدود شده است و لذا فقط از منابع خودروی این گیاه برای مصارف دارویی در طب سنتی استفاده می‌شود و هیچ برنامه‌ای برای کشت آن در سطح وسیع وجود ندارد که دلیل آن را به عدم شناخت دقیق کلیه ویژگی‌های این گیاه می‌توان نسبت داد. در بررسی‌های قبلی از صمغ جاوشیر برای تهیه فیلم خوراکی استفاده شده است که فیلم حاصل ضمن داشتن نفوذپذیری به بخار آب و حلالیت بالا، خواص فیزیکی ضعیفی نیز داشته است (Rajaei and Shekarchizadeh, 2019). از آنجایی‌که صمغ جاوشیر، صمغی طبیعی، بومی و ارزان قیمت می باشد و امکان کشت گسترده آن در مناطق مختلف کشور وجود دارد، لذا در این تحقیق بهبود خواص فیلم تهیه شده از صمغ جاوشیر با استفاده از نانوذرات و رزین حاصل از صمغ جاوشیر مد نظر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج صمغ و رزین جاوشیر

صمغ جاوشیر نوعی صمغ–رزین است، لذا ابتدا باید جداسازی انجام شود. در مرحله استخراج الکلی برای جداسازی صمغ و رزین، ابتدا صمغ های ناخالص آسیاب شده و سپس با ۳۰ برابر اتانول ۹۶ درصد به مدت هفت ساعت در دستگاه سوکسله رفلاکس داده شد. پس از این زمان الکل مورد استفاده که رزین را درون خود حل کرده بود را جدا کرده و درون ظرف درب بسته نگهداری شد. سپس مواد جامد باقی مانده از رفلاکس با الکل در دمای اتاق خشک شد که پودر سفید رنگی به‌دست آمد. در مرحله استخراج آبی، محلول پنج درصد از پودر سفید رنگ در آب دیونیزه تهیه شد و این محلول به مدت چهار ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس محلول به‌دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ (Z3HK، Hermel، آلمان) شد و محلول رویی موجود در فالکون‌ها روی یک کاغذ صافی با منافذ ریز صاف شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. در نهایت صمغ خالص خشک شده درون ظرف درب بسته در یخچال نگهداری شد (Rajaei, 2017، Lin et al., 2019).

تهیه و ارزیابی نانوذرات صمغ جاوشیر

ابتدا محلول ۲۰ درصد وزنی– حجمی صمغ جاوشیر در استیک اسید ۵۰ درصد ساخته شد و تحت فرآیند الکتروپاشش (دستگاه الکتروریسی با ولتاژ بالا، ایران) موجود در آزمایشگاه پژوهشی گروه صنایع غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان با ولتاژ ۲۰ کیلوولت و با فاصله نوک سوزن تا غلتک ۱۰ سانتی‌متر تولید شد. نانوذرات تهیه شده از روی غلتک جمع‌آوری شد و به‌منظور بررسی شکل و اندازه ذرات آنها، نانوذرات حاصل با روکش طلا پوشانیده شدند و تصاویر آنها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (XL30، Philips، هلند) موجود در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی اصفهان با بزرگنمایی‌های مختلف تهیه شدند و در نهایت توسط نرم‌افزار image J متوسط قطر ذرات ارزیابی شد (Wen et al., 2016).

تهیه فیلم جاوشیر

برای تهیه فیلم جاوشیر ابتدا محلول حاوی ۲/۵ درصد صمغ استخراج شده و ۱/۳ درصد گلیسرول در آب دیونیزه تهیه شد. سپس از یک پارچه نازک به‌منظور حذف حباب‌های هوا عبور داده و به صورت یک لایه یکنواخت درون پلیت شیشه‌ای روکش داده شده با تفلون ریخته شد و به‌منظور خشک شدن به مدت ۴۴ ساعت درون آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه برای پاشش نانوذرات صمغ جاوشیر بر سطح فیلم‌ها، فیلم‌های تهیه شده روی فویل‌های آلومینیومی و بر روی غلتک دستگاه الکتروپاشش گذاشته شدند و محلول صمغ جاوشیر با استفاده از دستگاه الکتروپاشش به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه روی آنها الکتروپاشی شد. به‌منظور تعیین میزان نانوذرات اضافه شده به فیلم‌ها، وزن فیلم قبل و بعد از الکتروپاشش با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. فیلم‌هایی که در معرض پاشش نانوذرات به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه بودند به‌ترتیب حاوی ۰/۰۴۴ و ۰/۰۹۱ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع نانوذرات صمغ جاوشیر بودند. در ادامه به‌منظور پوشش‌دهی سطح فیلم‌ها با رزین، از محلول اتانولی مرحله استخراج صمغ که حاوی رزین تغلیظ شده (۴/۷ درصد) بود استفاده شد و به میزان ۱۶/۵ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع بر روی سطح فیلم ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد خشک شد و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. فیلم جاوشیر حاوی رزین تحت عنوان فیلم رزین و فیلم‌های حاوی نانوذرات و رزین تحت عنوان فیلم نانو ۳۰+ رزین و فیلم نانو ۶۰+ رزین نامگذاری شدند.

ارزیابی فیلم های تهیه شده

ضخامت

ضخامت فیلم‌ها با استفاده از میکرومتر دیجیتال دستی با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متراندازه‌گیری شدند. این اندازه‌گیری‌ها حداقل در چهار موقعیت مکانی فیلم به‌طور تصادفی صورت پذیرفت.

حلالیت در آب (WS)

نمونه‌های فیلم ($4\times 4\ cm^2$) برش داده شدند و درون آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند و سپس بلافاصله سرد شدند و به‌وسیله ترازو وزن شدند (W_0). نمونه‌ها در مدت زمان ۳ دقیقه درون آب مقطر قرار داده شدند. تکه‌های فیلم حل نشده در آب جدا شدند و در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و وزن شدند (W_f). حلالیت به‌وسیله فرمول زیر تعیین شد:

$$WS\ \% = ((W_0 - W_f) / W_0) \times 100 \quad (۱)$$

نفوذپذیری به بخار آب

آزمون اندازه‌گیری نفوذپذیری با استفاده از روش اصلاح شده شماره E96 مصوب ASTM انجام گرفت (Mighan and Mohammadi Nafchi, 2017). برای این آزمایش درون ظروف شیشه‌ای با ارتفاع ۴/۵ سانتی‌متر به قطر ۲ سانتی‌متر سه گرم کلسیم کلرید خشک که رطوبت نسبی معادل صفر ایجاد می‌کند وزن شد. روی درپوش این ظروف منفذی به قطر ۸ میلی‌متر قرار دارد که قطعه‌ای از فیلم مورد نظر در روی این منفذ قرار گرفت. ظروف شیشه‌ای همراه با محتویات آن توزین شد و درون دسیکاتور حاوی آب مقطر قرار گرفت. آب مقطر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد ایجاد می‌کند. دسیکاتور حاوی ظرف نمونه در دمای محیط به مدت۷۲ ساعت قرار داده شد. در این مدت هر ۲۴ ساعت یک بار در ساعت معین تغییر وزن ظروف با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ ثبت و نمودار آن به صورت تابعی از زمان رسم شد. منحنی افزایش وزن ظرف ها با گذشت زمان رسم و شیب خط آن به‌دست آمد. از تقسیم شیب خط مربوط به هر ظرف به سطح کل فیلم که در معرض انتقال بخار قرار دارد، سرعت انتقال بخار آب (WVTR) محاسبه و سپس با استفاده از معادله زیر نفوذ پذیری نسبت به بخار آب (WVP) محاسبه شد (Qazanfarzadeh et al., 2021):

$$WVP = \frac{WVTR}{P\,(R1 - R2)} \times X \quad (۲)$$

در این معادله X ضخامت فیلم، P فشار بخار آب خالص در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، R_1 رطوبت نسبی در دسیکاتور (۱۰۰ درصد) و R_2 درصد رطوبت نسبی در داخل ظرف شیشه‌ای است.

تست کشش

ویژگی‌های مکانیکی نمونه‌های فیلم از طریق آزمون‌های کششی با استفاده از دستگاه بافت‌سنج بر اساس دستورالعمل روش استاندارد ASTM D882 تعیین شد. برای این آزمون، فیلم‌ها در ابعاد مستطیلی $۶\times ۱cm^2$ برش داده شد و ضخامت آن‌ها در سه نقطه مختلف اندازه گیری و میانگین آن‌ها در محاسبات استفاده شد. نمونه‌ها در فک مخصوص دستگاه اینستران قرار گرفت و فک بالایی با سرعت ۵۰ mm/min به سمت بالا حرکت کرد. از طریق فرمول‌های زیر استحکام کششی و درصد کشیدگی در نقطه شکست محاسبه گردید:

استحکام کششی = بیشینه نیروی وارد شده برحسب نیوتن/ ضخامت× عرض) (۳)

درصد کشیدگی = (تغییر طول/ طول اولیه) × ۱۰۰ (۴)

در نقطه شکست

زاویه تماس

میزان آبگریزی فیلم با استفاده از روشی که در آن زاویه تماس قطره آب با سطح نمونه اندازه‌گیری می شود، تعیین شد. قطره‌های آب ۵ میکرولیتری به‌صورت تصادفی روی ۷ نقطه از سطح فیلم قرار داده شدند و میانگین آن ها به‌عنوان زاویه تماس استاتیک گزارش شد (Qazanfarzadeh et al., 2021).

بررسی ریز ساختار فیلم تولید شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای تهیه تصاویر میکروسکوپی از سطح فیلم‌ها، آنها با کمک چسب دو طرفه بر روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. در آماده‌سازی نمونه‌ها برای تصویربرداری از مقطع عرضی ابتدا نمونه‌ها در ازت مایع شکسته شدند و سپس از سمت مقابل قسمت شکسته شده به کمک چسب دو طرفه بر روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. پایه‌ها در یک دستگاه پوشش‌دهنده به مدت ۵ دقیقه با طلا پوشش داده شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها به‌وسیله یک میکروسکوپ الکترونی (XL30، Philips، هلند) موجود در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی اصفهان در بزرگنمایی‌های مختلف انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

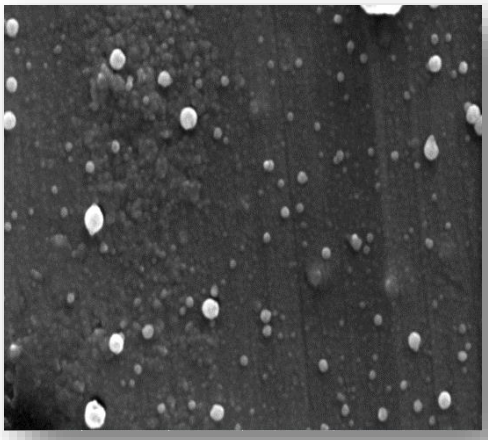
اندازه‌گیری‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد. برای آنالیز آماری نمونه‌ها از روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. آزمون مقایسه میانگین داده‌ها به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

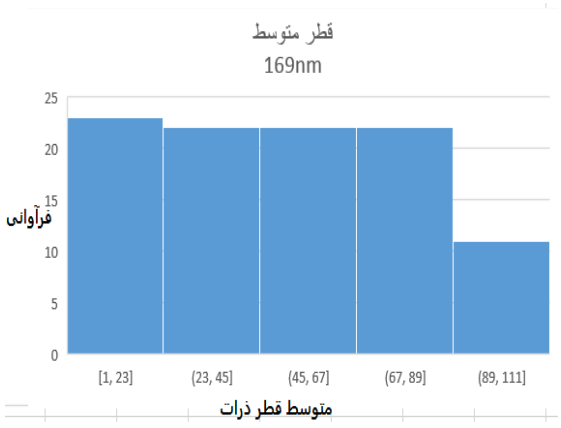
نتایج و بحث

ارزیابی نانوذرات صمغ جاوشیر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نانوذرات تولید شده را نشان می‌دهد. در شکل ۱ سمت چپ منحنی توزیع اندازه ذرات

مربوط به نانوذرات تولید شده نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که ذرات تولید شده کروی شکل و در ابعاد نانو هستند. فرورفتگی‌های قابل مشاهده در سطح ذرات به دلیل خروج سریع حلال طی الکتروپاشش است. متوسط قطر ذرات تولید شده ۳۱/۸۱ ±۱۶۹ نانومتر محاسبه شد.





شکل ۱- تصویر SEM نانوذرات با بزرگنمایی x ۱۲۰۰۰۰ (راست) و توزیع قطر نانوذرات با استفاده از ImageJ (چپ) صمغ جاوشیر
Fig. 1. SEM image of nanoparticles at 12000 x (right) and distribution of nanoparticles diameter using ImageJ (left) of opopanax gum

ارزیابی فیلم‌های تهیه شده

ضخامت

نتایج نشان می‌دهد که استفاده از رزین جاوشیر در پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر اثر معنی‌داری بر ضخامت فیلم‌ها داشته است (P<۰/۰۵). این در حالی است که استفاده از نانوذرات صمغ جاوشیر تاثیر معنی‌داری بر ضخامت فیلم‌ها نداشته است. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، افزودن نانوذرات به فیلم جاوشیر و فیلم پوشش‌دهی شده با رزین جاوشیر سبب افزایش معنی‌دار ضخامت فیلم‌ها نشده است.

جدول ۱- ضخامت فیلم های مختلف
Table 1- Thickness of different films

ضخامت (میلی‌متر) Thickness (mm)	تیمار Treatment
0.383± 0.054 [b]	فیلم شاهد (Control film)
0.381± 0.028 [b]	فیلم نانو ۳۰ (Nano 30 film)
0.433± 0.048[a]	فیلم نانو ٦۰ (Nano 60 film)
0.421± 0.040 [a]	فیلم رزین (Resin film)
0.411± 0.034 [ab]	فیلم نانو ۳۰+ رزین (Nano 30+ resin film)
0.402± 0.035 [ab]	فیلم نانو ٦۰+ رزین (Nano 60+ resin film)

–حروف مختلف نشان دهنده معنی داری است (p < ۰/۰۵)
Different letters indicate significant differences (p<0.05).

پس از پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر با رزین آن، ضخامت فیلم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. مساله‌ای که باید به آن دقت کرد این است که ضخامت فیلم شاهد و فیلم‌های حاوی نانوذرات که پوشش رزینی نداشته‌اند در مقایسه با فیلم‌های حاوی نانوذرات و پوشش رزینی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. این در حالی است که پوشش رزینی به تنهایی باعث افزایش ضخامت فیلم جاوشیر شده است. دلیل آن را می‌توان به جذب آب بالای صمغ جاوشیر نسبت داد. جذب آب بالای فیلم جاوشیر در مطالعه Rajaei (2017) مورد تایید قرار گرفته است. ضخامت فیلم جاوشیر در اثر جذب رطوبت محیط به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و افزودن مقدار زیادی نانوذرات جاوشیر به فیلم،

این مسئله را تشدید می‌کند به‌گونه‌ای که فیلم نانو ۶۰ ضخامتی شبیه فیلم رزین پیدا کرده است. به‌نظر می‌رسد در مقادیر بالای نانوذرات، تجمع ذرات رخ می‌دهد که این امر منجر به بالا رفتن اندازه ذرات می‌شود و در نتیجه تغییرات ناشی از وارد شدن به ابعاد نانو کاهش می‌یابد و رفتار ذرات شبیه پلیمر اولیه می‌شود. وجود مقدار زیاد نانوذرات در فیلم نانو۶۰ باعث افزایش جذب رطوبت محیط توسط این فیلم‌ها می‌شود. پوشش‌دهی سطح فیلم‌ها با رزین شدت جذب رطوبت توسط نانوذرات را کاهش داده که به دلیل ماهیت آبگریز رزین می‌باشد و این سبب شده در فیلم‌های نانو ۳۰+ رزین و نانو ۶۰+ رزین افزایش ضخامت نسبت به فیلم رزین ایجاد نشود. در مطالعه Nafchi و Mirzari (۲۰۱۵) اثر نانواکسید روی بر خواص فیلم‌های زیست کامپوزیتی بر پایه ژلاتین ماهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که ضخامت کلی فیلم‌های نانوکامپوزیتی به‌دست آمده با اضافه کردن نانوذرات، بدون تغییر باقی مانده بود (Nafchi and Mirzari, 2015).

حلالیت در آب

حلالیت در آب یک فاکتور مهم در تعریف کاربردهای ممکن برای فیلم‌های پلیمری خوراکی است. بیشتر پلیمرهای طبیعی به رطوبت حساس و محلول در آب هستند که می‌توان با روش‌های مختلف مانند گنجاندن ترکیبات چربی با منشا خوراکی در فیلم‌ها، استفاده از نانوذرات و یا با ایجاد پیوندهای عرضی حلالیت را کاهش داد. انحلال‌پذیری پایین آب ویژگی مطلوبی برای بسته‌بندی مواد غذایی است، زیرا فیلم‌های بسته‌بندی با چنین ویژگی‌هایی می‌توانند در برابر شرایط با رطوبت بالا مقاوم باشند. جدول ۲ حلالیت در آب فیلم‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که فیلم جاوشیر بیشترین حلالیت در آب را دارد. انحلال‌پذیری فیلم‌ها در آب با افزودن نانوذرات کاهش یافته است. پوشش‌دهی سطح فیلم‌ها با رزین نیز کاهش حلالیت را به همراه داشته است. فیلم شاهد به علت آبدوست بودن، حلالیت در آب بالایی دارد. حلالیت بالای این فیلم‌ها به حضور گروه‌های هیدروکسیل و وجود نرم‌کننده هیدروفیل (گلیسرول) نسبت داده می‌شود. کاهش حلالیت با اضافه کردن نانو ذرات صمغ جاوشیر را می‌توان به تشکیل پیوندهای هیدروژنی قوی بین پلیمر جاوشیر و ذرات نانو که باعث استحکام بیشتر فیلم می‌گردد، نسبت داد. همچنین کاهش حلالیت در اثر پوشش‌دهی با رزین را به ماهیت آبگریز این ماده می‌توان نسبت داد. در تحقیقی که توسط Ghazihoseini و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد دریافتند که با افزایش محتوی نانورس به فیلم‌های پروتئین محلول در آب سویا، حلالیت در آب به دلیل شکل‌گیری پیوندهای هیدروژنی قوی بین ماتریکس پروتئین سویا و نانوذرات کاهش پیدا می‌کند (Ghazihoseini et al., 2015).

جدول ۲- حلالیت در آب فیلم های مختلف

Table 2- Water solubility of different films.

حلالیت در آب (٪) Water solubility (%)	تیمار Treatment
85.84	فیلم شاهد (Control film)
76	فیلم نانو۳۰ (Nano 30 film)
70.84	فیلم نانو٦۰ (Nano 60 film)
40	فیلم رزین (Resin film)
32.5	فیلم نانو۳۰+ رزین (Nano 30+ resin film)
17.67	فیلم نانو٦۰+ رزین (Nano 60+ resin film)

نفوذپذیری به بخار آب

میزان نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های خوراکی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مورد بررسی می‌باشد. از آنجایی که فیلم حاصل از صمغ جاوشیر نفوذپذیری به بخار آب بالایی دارد، ممانعت یا به حداقل رساندن انتقال رطوبت بین اتمسفر محیط و ماده غذایی یکی از هدف های این پژوهش بود. به همین دلیل از نانو ذرات جاوشیر و رزین جاوشیر استفاده شد. نتایج نشان داد که پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر با رزین و استفاده همزمان نانوذرات و رزین سبب تغییر معنی‌دار نفوذپذیری به بخار آب فیلم جاوشیر شده است ($P<0/05$). این در حالی است که افزودن نانوذرات به فیلم جاوشیر به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر نفوذپذیری به بخار آب فیلم جاوشیر نداشته است. نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که چنانچه نانوذرات در مقادیر کم به فیلم جاوشیر افزوده شود تاثیر معنی‌داری بر نفوذپذیری به بخار آب فیلم ندارد به‌طوری که فیلم شاهد و فیلم نانو ۳۰ اختلاف معنی‌داری از نظر نفوذپذیری به بخار آب نداشتند. این در حالی است که مقادیر بالای نانوذرات جاوشیر به دلیل بالا بردن ماهیت آبدوست فیلم نانو ۶۰، نفوذپذیری به بخار آب را به طور معنی‌داری افزایش داده است. پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر با لایه رزین به‌طور معنی‌داری نفوذپذیری به بخار آب فیلم را کاهش داده

است به‌گونه‌ای که کمترین میزان نفوذپذیری مربوط به فیلم رزین است که به ماهیت آبگریز این ترکیب مربوط می‌شود. پوشش رزین در فیلم نانو ۶۰+ رزین توانسته اثر مخرب نانوذرات در نفوذپذیری به بخار آب را کاهش دهد به‌گونه‌ای که نفوذپذیری به بخار آب آن با فیلم شاهد اختلاف معنی‌داری ندارد. Hashemi و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که برهمکنش همزمان نانوذرات رس و کیتوزان باعث کاهش نفوذ پذیری به بخار آب شده و ذرات نانو به تنهایی اثر معنی داری نداشت (Hashemi et al., 2018).

جدول ۳- نفوذ پذیری به بخار آب فیلم های مختلف

Table 3- Water vapor permeability of different films

نفوذ پذیری به بخار آب ($\times 10^{-9}$ g m/ Pa s m^2) WVP ($\times 10^{-9}$ g m/ Pa s m^2)	تیمار Treatment
2.33±0.29 ^{b}	فیلم شاهد (Control film)
1.97±0.80 ^{b}	فیلم نانو۳۰ (Nano 30 film)
3.03±0.23 ^{a}	فیلم نانو٦۰ (Nano 60 film)
1.24±0.82 ^{c}	فیلم رزین (Resin film)
2.47±0.76 ^{ab}	فیلم نانو۳۰+ رزین (Nano 30+ resin film)
2.06±0.67 ^{b}	فیلم نانو٦۰+ رزین (Nano 60+ resin film)

-حروف مختلف نشان دهنده معنی داری است (p < ۰/۰۵)

Different letters indicate significant differences (p<0.05).

آزمون بافت‌سنجی

از جمله خصوصیات مهم فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر مقاومت کششی (TS) و کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن (EAB) است. مقاومت کششی، حداکثر کششی است که فیلم تحمل می‌کند تا پاره شود و کشیدگی یا افزایش طول در نقطه شکست، درصد افزایش طول نمونه در زمان پاره شدن است. کشش‌پذیری بالای فیلم، همیشه یک مشخصه مطلوب است که با درصد بالای افزایش طول در زمان پاره شدن، مشخص می‌شود (Parris et al., 1995).

افزودن نانوذرات به فیلم جاوشیر و فیلم حاوی پوشش رزینی اثر معنی‌داری بر کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن فیلم جاوشیر داشته است (P<۰/۰۵). این در حالی است که پوشش‌دهی سطح فیلم با رزین به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر این پارامتر نداشته است. نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که بیشترین کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن مربوط به فیلم شاهد است. بالا بودن کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن در فیلم شاهد به ماهیت پلیمر جاوشیر و وجود مقدار قابل توجه گلیسرول در فیلم شاهد نسبت داده شده است (Rajaei, 2017). افزودن نانوذرات جاوشیر به فیلم جاوشیر سبب شده که کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن به شدت کاهش یابد. حضور نانوذرات به‌خودی خود سبب کاهش کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن می‌شود و مقدار نانوذرات اثر معنی‌داری بر این کاهش ندارد. کاهش کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن در اثر حضور نانوذرات در فیلم‌ها به برهمکنش نانوذرات با رنجیرهای پلیمری جاوشیر از طریق برهمکنش‌های بین مولکولی مانند پیوندهای هیدروژنی و در نتیجه کاهش تحرک زنجیره پلیمری نسبت داده می‌شود. پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر با لایه رزین سبب کاهش عددی کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن فیلم حاصل نسبت به فیلم شاهد شده است ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نشده است. جالب توجه است که در فیلم‌های نانو ۳۰ + رزین و نانو۶۰+ رزین که نانوذرات و رزین به‌طور همزمان وجود دارند، اثر نانوذرات غالب بوده و کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن این فیلم ها کاهش قابل توجهی یافته است.

افزودن نانوذرات به فیلم جاوشیر و فیلم پوشش‌دهی شده با رزین، باعث تغییر معنی‌دار مقاومت کششی فیلم شده است (P<۰/۰۵). نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد که فیلم شاهد مقاومت کششی بسیار پایینی دارد. استحکام کششی بسیار پایین فیلم جاوشیر را به ماهیت مولکولی و حضور گلسیرول بالا در این فیلم ها نسبت داده‌اند (Rajaei, 2017). افزودن نانوذرات به فیلم جاوشیر باعث افزایش معنی‌دار مقاومت کششی فیلم حاصل شده است. البته شبیه نتایج کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن مقدار نانوذره اضافه شده تاثیر معنی‌داری بر افزایش مقاومت کششی فیلم حاصل نداشته است. نتایج همچنین نشان می‌دهد که پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر با لایه رزینی نتوانسته باعث تغییر معنی‌دار مقاومت کششی فیلم شاهد شود. اگر چه مقاومت کششی فیلم رزین از نظر عددی کاهش یافته است و کمترین میزان را در بین فیلم‌های حاصل دارد. نکته جالب توجه این است که افزودن نانوذرات به فیلم جاوشیر و سپس پوشش‌دهی آن با رزین جاوشیر به شدت باعث افزایش مقاومت کششی فیلم جاوشیر شده است و در اینجا مقدار نانوذرات مصرفی بر نتایج مقاومت کششی تاثیر معنی‌دار داشته است به‌گونه‌ای که فیلم نانو ۳۰ +رزین و بعد از آن فیلم نانو ۶۰ +رزین بالاترین مقاومت کششی را

در میان فیلم‌های تهیه شده دارند. افزایش مقاومت کششی فیلم‌های حاوی نانوذرات به برقراری برهمکنش بین نانوذرات و زنجیرهای پلیمری نسبت داده می‌شود. در واقع افزودن نانوذرات به فیلم‌ها موجب می‌شود تا تنش به‌طور یکنواخت در فیلم توزیع شده و از این‌رو خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها بهبود می‌یابند.

Yixiang و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی پیرامون خصوصیات فیلم نانوکامپوزیت کیتوزان/ نانورس مونتموریلونیت گزارش نمودند که با افزودن نانورس تا کمتر از ۵ درصد، استحکام کششی فیلم نانوکامپوزیت افزایش یافته و توزیع نانورس در ماتریکس کیتوزان به‌صورت ساختار ورقه‌ای بوده که سازگاری مناسب و بالای بیوپلیمر و نانو رس را نشان می‌دهد (Yixiang et al., 2006).

جدول ٤- کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن فیلم‌های مختلف

Table 4- Elongation at break of different films

تیمار Treatment	کشش پذیری تا نقطه پاره شدن(%) Elongation at break (%)
فیلم شاهد (Control film)	284.16± 174.63 [a]
فیلم نانو۳۰ (Nano 30 film)	82.45± 30.66 [b]
فیلم نانو٦۰ (Nano 60 film)	75.09± 31.01 [b]
فیلم رزین (Resin film)	228.24± 12.71 [a]
فیلم نانو۳۰+رزین (Nano 30+ resin film)	60.53± 2.72 [b]
فیلم نانو٦۰+رزین (Nano 60+ resin film)	80.17± 7.10 [b]

-حروف مختلف نشان‌دهنده معنی‌داری است (p < ۰/۰۵)

Different letters indicate significant differences (p<0.05).

جدول ٥- مقاومت کششی فیلم های مختلف

Table 5- Tensile strength of different films

تیمار Treatment	مقاومت کششی(MPa) Tensile strength (MPa)
فیلم شاهد (Control film)	14.25± 2.44 [d]
فیلم نانو۳۰ (Nano 30 film)	68.22± 25.87 [c]
فیلم نانو٦۰ (Nano 60 film)	97.85± 88.30 [c]
فیلم رزین (Resin film)	0.83 ±0.72 [d]
فیلم نانو۳۰+رزین (Nano 30+ resin film)	302.9± 47.09 [a]
فیلم نانو٦۰+رزین (Nano 60+ resin film)	82.19± 25.42 [b]

-حروف مختلف نشان‌دهنده معنی‌داری است (p < ۰/۰۵)

Different letters indicate significant differences (p<0.05).

زاویه تماس

با توجه به اندازه زاویه تماس آبدوستی یا آبگریزی سطح جامد مشخص می‌شود. اگر زاویه تماس کمتر از ۳۰ درجه باشد، قطره آب سطح را کاملا مرطوب می‌کند و سطح آبدوست خواهد بود. اگر زاویه تماس بین ۳۰ تا ۸۹ درجه باشد، سطح به‌طور نسبی آبگریز است و اگر زاویه تماس بیش از ۹۰ درجه باشد، سطح آبگریز در نظر گرفته می‌شود. مواد مورد استفاده در بسته‌بندی باید تا حد امکان حساسیت به رطوبت کمتری داشته باشند. هرچه زاویه تماس قطره آب با فیلم بسته‌بندی بیشتر باشد، آن ماده قابلیت بیشتری برای بسته‌بندی دارا می‌باشد و بالعکس (Rajaei, 2017).

افزودن نانوذرات به فیلم جاوشیر و یا پوشش‌دهی سطح فیلم با رزین به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر اثر معنی‌داری بر زاویه تماس فیلم‌ها دارند (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج جدول ۶ می‌توان گفت که فیلم شاهد کمترین زاویه تماس یعنی بیشترین آبدوستی را در میان فیلم های تهیه شده دارد که به ماهیت پلی‌ساکاریدی این صمغ مربوط است. افزودن نانوذرات صمغ جاوشیر به شدت زاویه تماس و به عبارتی آبگریزی را افزایش داده است. افزایش آبگریزی تاییدکننده کاهش حلالیت فیلم‌ها در اثر افزودن نانوذرات به فیلم می‌باشد. اما جالب توجه است که میزان نانوذرات اضافه شده بر زاویه تماس اثر معنی‌داری داشته به‌گونه‌ای که در فیلم نانو ۶۰ که مقدار نانوذرات استفاده شده افزایش

یافته است، زاویه تماس کاهش یافته و آبگریزی آن با فیلم شاهد اختلاف معنی‌داری نداشته است. به‌نظر می‌رسد در مقادیر بالای نانوذرات، تجمع ذرات رخ می‌دهد که این امر منجر به بالا رفتن اندازه ذرات می‌شود و در نتیجه تغییرات ناشی از وارد شدن به ابعاد نانو را کاهش می‌دهد و رفتار ذرات را شبیه پلیمر اولیه می‌کند. نتایج زاویه تماس با نتایج رطوبت همخوانی دارد و در نتیجه می‌توان گفت هرچه رطوبت نمونه بیشتر باشد لذا زاویه تماس نمونه هم کمتر است (نمونه شاهد) و با کاهش رطوبت نمونه‌ها، زاویه تماس افزایش پیدا خواهد کرد.

پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر با لایه رزین سبب افزایش معنی دار زاویه تماس و به عبارتی افزایش آبگریزی فیلم رزین شده است که به ماهیت آبگریز رزین مربوط است. جالب توجه این است که در فیلم جاوشیر حاوی نانوذرات پس از پوششی‌دهی با رزین، اثر نانوذرات بر زاویه تماس متفاوت می‌شود به‌گونه‌ای که مقدار کمتر نانوذرات در فیلم نانو ۳۰+ رزین تاثیر معنی‌داری بر زاویه تماس نداشته ولی میزان بالاتر ذرات سبب افزایش معنی‌دار زاویه تماس و در نتیجه افزایش آبگریزی فیلم نانو ۶۰+ رزین شده است به‌گونه‌ای که بیشترین زاویه تماس را در بین فیلم‌های مورد بررسی داشته است. به‌نظر می‌رسد نانوذرات مورد استفاده باعث افزایش سطح فیلم شده‌اند و زمانیکه رزین بر روی این سطح توسعه یافته قرار گرفته است، سطح آبگریز فیلم را به شدت افزایش داده است. Atef و همکاران (۲۰۱۵)، بعد از اضافه کردن اسانس پونه به فیلم نانوکامپوزیت مشاهده کردند که زاویه تماس به شکل معنی داری افزایش یافته است. افزایش زاویه تماس فیلم‌های فعال در قیاس با فیلم نانوکامپوزیت احتمالاً ناشی از حضور اسانس با طبیعت آبگریز است که آبگریزی سطح را افزایش داده و متعاقباً از ورود آب به داخل ساختار زیست پلیمر ممانعت کرده است (Atef et al., 2015).

جدول ٦- زاویه تماس فیلم های مختلف

Table 6- Contact angle of different films

زاویه تماس Contact angle	تیمار Treatment
12.33± 0.85 c	فیلم شاهد (Control film)
89.77± 9.92 b	فیلم نانو ۳۰ (Nano 30 film)
17.16± 1.10 c	فیلم نانو ٦۰ (Nano 60 film)
84.54± 9.15 b	فیلم رزین (Resin film)
90.43± 7.26 b	فیلم نانو ۳۰+ رزین (Nano 30+ resin film)
103.07± 14.05 a	فیلم نانو ٦۰+ رزین (Nano 60+ resin film)

–حروف مختلف نشان‌دهنده معنی‌داری است (p < ۰/۰۵)

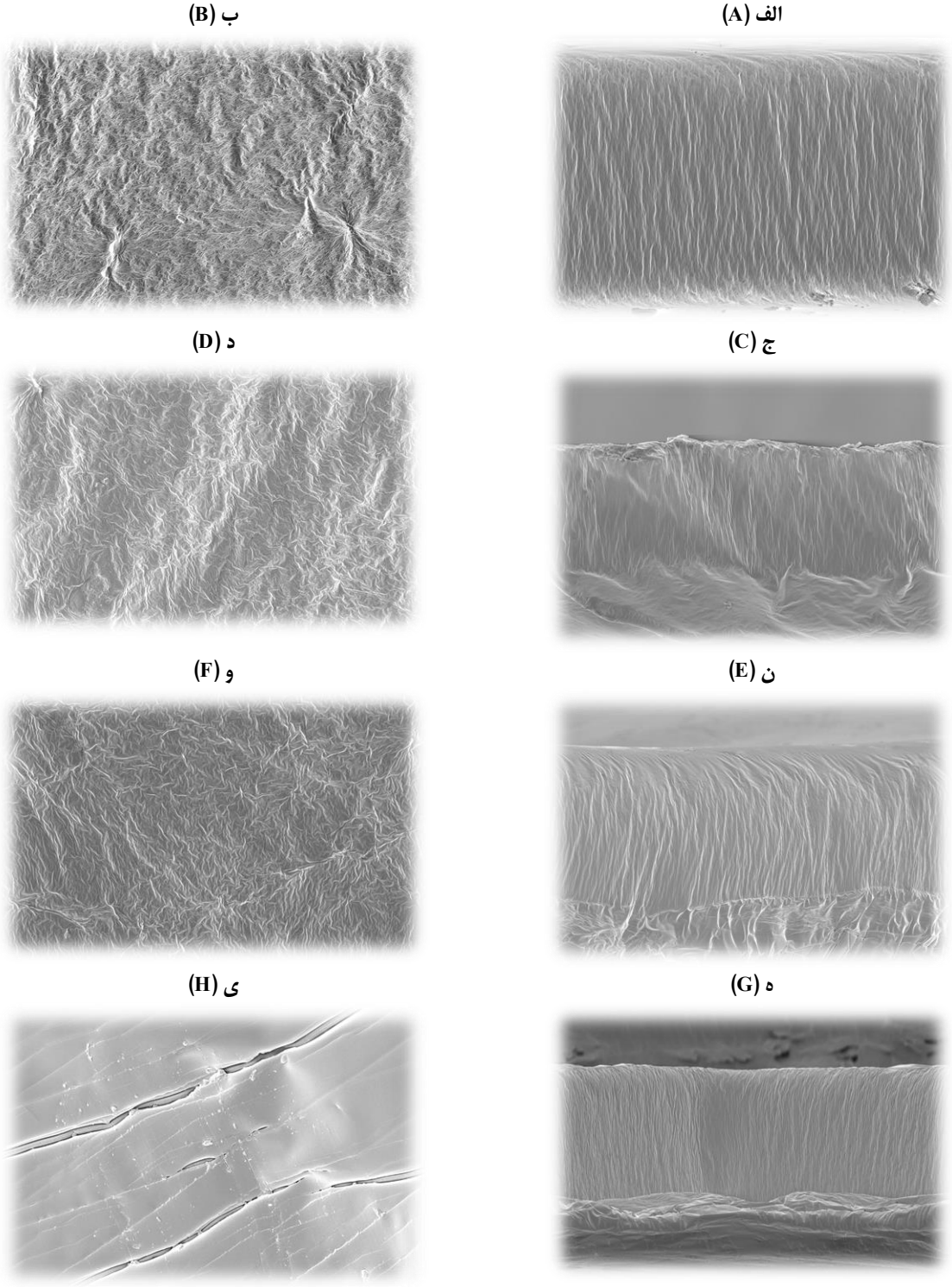
Different letters indicate significant differences (p<0.05).

بررسی ساختار فیلم‌های تهیه شده با استفاده از SEM

شکل ۲ تصاویر SEM از مقطع عرضی و سطح فیلم‌های شاهد، نانو ۳۰، رزین و نانو ۶۰+ رزین است. زبری سطح فیلم حاصل از صمغ جاوشیر قابل مشاهده می‌باشد. شکل ۲ سطحی کدر و یک دست از فیلم شاهد را نشان می‌دهند. با اضافه کردن نانوذرات به سطح، مشاهده می‌شود که برجستگی‌هایی در سطح ایجاد شده است که تاییدکننده حضور نانوذارت است. شکل ۲ به‌خوبی پوشش‌دهی سطح با رزین را تایید می‌کند. کاهش کدورت و زبری نسبت به فیلم شاهد ضمن یک دست بودن نشان‌دهنده پوشش رزین است. حضور نانوذرات در فیلم پوشش‌دهی شده با رزین کاهش شدید کدورت و زبری سطح را نشان می‌دهد. این شکل توجیهات قبلی را تایید می‌کند که با افزودن نانوذرات در مقادیر بالا، سطح به شدت افزایش می‌یابد و زمانیکه رزین بر روی این سطح گسترده قرار می‌گیرد تاثیرات سطحی چشمگیری پیدا می کند. Ghasemloo و همکاران (۲۰۱۲) تهیه و بررسی بیوفیلم بسته بندی زیست تخریب‌پذیر ضدمیکروبی بر پایه نشاسته ذرت را بررسی کردند. تصاویر عرضی و سطحی میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که ریزساختار فیلم‌های شاهد دارای سطوحی صاف و یکنواخت بوده و هیچ گونه خلل و فرج و ترکی در آنها مشاهده نمی‌شود. سطح رویی فیلم هیدروفوب ساختاری ناصاف داشت که نشان‌دهنده حضور اسید چرب در این قسمت بوده است (Ghasemloo et al., 2012).

نتیجه‌گیری

نفوذپذیری به بخار آب فیلم شاهد نسبت به سایر فیلم‌های خوراکی بسیار بالا است. افزودن نانوذرات باعث افزایش نفوذپذیری به بخار آب شد ولی پوشش‌دهی با رزین کاهش این پارامتر را به همراه داشت. بیشترین کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن مربوط به فیلم شاهد است. افزودن نانوذرات جاوشیر به فیلم جاوشیر سبب شده که کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن به شدت کاهش یابد.



شکل ۲- تصویر SEM فیلم شاهد (مقطع عرضی (الف) و سطح (ب))، فیلم نانو ۳۰ (مقطع عرضی (ج) و سطح (د))، فیلم رزین (مقطع عرضی (ن) و سطح (و)) و فیلم نانو ٦۰ + رزین (مقطع عرضی (ه) و سطح (ی)) با بزرگنمایی 1000 x.

Fig. 2. SEM images of control film (cross section (A) and surface (B)), nano 30 film (cross section (C) and surface (D)), resin film (cross section (E) and surface (F)) and nano 60 + resin film (cross section (G) and surface (H)) at 1000 x.

پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر با لایه رزین سبب کاهش عددی کشش‌پذیری تا نقطه پاره شدن فیلم حاصل شده است ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نشده است. نتایج همچنین نشان می‌دهد که پوشش‌دهی سطح فیلم جاوشیر با لایه رزینی نتوانسته باعث تغییر معنی‌دار مقاومت کششی فیلم شاهد شود اگر چه مقاومت کششی فیلم رزین از نظر عددی کاهش یافته است و کمترین میزان را در بین فیلم‌های حاصل دارد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از تست زاویه تماس می‌توان گفت که فیلم شاهد کمترین زاویه تماس یعنی بیشترین آبدوستی را در میان فیلم‌های تهیه شده دارد که به ماهیت پلی‌ساکاریدی این صمغ مرتبط است. افزودن نانوذرات صمغ جاوشیر و همچنین پوشش‌دهی با رزین به شدت زاویه تماس و در نتیجه آبگریزی را افزایش داده است. تصاویر SEM به‌دست آمده از فیلم‌های تهیه شده نشان داد وجود ذرات نانو به همراه رزین تا حد زیادی از زبری نمونه می‌کاهد. لذا با در نظر گرفتن مجموع عوامل مورد نظر برای یک فیلم مطلوب، می توان فیلم نانو ۳۰+ رزین را به‌عنوان بهترین فیلم انتخاب کرد. نتایج نشان داد استفاده از رزین و نانوذرات جاوشیر به‌خوبی سبب بهبود ویژگی‌های فیلم ضعیف جاوشیر می‌شود. در نهایت می‌توان گفت فیلم تهیه شده در این تحقیق به دلیل نفوذپذیری به بخار آب کم و کشش‌پذیری بالا می‌تواند برای استفاده در بسته‌بندی‌های چند لایه مواد غذایی گزینه بسیار خوبی باشد.

منابع

1. A-Munshi, A. M, Singh, V. N., Kumar, M., and Singh, J. P. (2008). Effect of nanoparticle size on sessile droplet contact angle. *J. Appl. Phys*. 103: 401-41.
2. Atef, M., Rezaei, M., and Behrooz, R. (2015). Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *Food Hydrocollied*. 45: 150-157.
3. Diaz-Visurraga, J., Mele´ndrez, M.F., Garcia, A., Paulraj, M., and Cardenas, G. (2010). Semitransparen chitosan-TiO2 nanotubes composite film for food package applications. *J. Appl. Polym. Sci*. 116: 3503–3515. https://doi.org/10.1002/app.31881
4. Ghasemloo, M., Khaksar, M. and Mardani, T. (2012). Preparation and evaluation of biodegradable and antimicrobial biofilm packaging based on corn starch. *Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran*. 5: 123-115.
5. Ghazihoseini, S., Alipoormazandarani, N., and Mohammadi Nafchi, A. (2015). The Effects of Nano-SiO_2 on Mechanical, Barrier, and Moisture Sorption Isotherm Models of Novel Soluble Soybean Polysaccharide Films. *Int. J. Food Eng*. 11: 833-840.
6. Hashemi, J. (2018). The effect of combined ratio of chitosan-bentonite nano clay on mechanical properties, permeability to water vapor and microstructure of nanocomposite film. *Journal of Food Processing and Preservation*. 10: 46-33.
7. Hattenhauer, I., Radomski, F. A. D., de Araujo Duarte, C., and Mamo, M. A. (2016). Epoxy resin in organic WORM memories: From capsuling to the active layer. Org. *Electron*. 34: 57-66. https://doi.org/10.1016/j.orgel.2016.04.018
8. Jada, S. S. (1988). The structure of urea—formaldehyde resins. *J. Appl. Polym. Sci*. 35: 1573-1592. https://doi.org/10.1002/app.1988.070350614
9. Kadivar, M. and Soltanizadeh, N. (2013). An introduction to the food industry. Learned Publications, Isfahan.
10. Kheradkhord, A. (2018). Determination of the physicochemical and functional properties of opopanax gum. MSc thesis, College of Agriculture, Isfahan University of Technology. Isfahan.
11. Khezri, Z. (2018). Encapsulation of garlic essential oil in nanofibers of opopanax gum. MSc thesis, College of Agriculture, Isfahan University of Technology. Isfahan.
12. Kubik T, Bogunia-Kubik K, and Sugisaka M. (2005). Nanotechnology on duty in medical applications. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 6: 17-33.
13. Li, J., Li, H., Zhao, Y., Hu, H., and Wang, Q. (2014). Hollow fiber taper with a silver micro-sphere used as refractive index sensor. Opt. Commun. 318: 7-10. https://doi.org/10.1016/j.optcom.2013.12.039
14. Lin, W., Shi, Q. Q., Chen, H., and Wang, J. N. (2019). Mechanical properties of carbon nanotube fibers reinforced epoxy resin composite films prepared by wet winding. *Carbon*. 153: 308-314. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.07.002
15. Liu, Y., Wang, S., and Lan, W. (2018). Fabrication of antibacterial chitosan-PVA blended film using electrospray technique for food packaging applications. Int. J. Biol. Macromol. 107: 848-854. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.044
16. Mighan Nasim, M. and Mohammadi Nafchi, R. (2017). Investigating the effect of nano zinc oxide on physicochemical properties and parameters of microbial growth equations of potato starch biocomposite. Islamic Azad University Publications. Shahrood 9: 96-87.
17. Nafchi, A. and Mirzaei, F. (2015). Evaluation of the effects of nano zinc oxide on the properties of biocomposite films based on fish gelatin. Islamic Azad University Publications. Shahrood 13: 57-67.

18. Parris, T., Coffin, D.R, Joubran, R.F and Pessen, H. (1995). Tensile properties of hydrophilic films. *J. Agri. Food Chem*. 43: 1432-1435. https://doi.org/10.1021/jf00054a004
19. Qazanfarzadeh, Z., Kadivar, M., Shekarchizadeh, H., Di Girolamo, R., Giosafatto, C. V. L. and Porta, R. (2021). Secalin enzymatically cross-linked by either papain and N-acetyl-DL-homocysteine thiolactone or transglutaminase: Improving of protein functional properties and film manufacturing. *Food Hydrocollied*. 120: 106912. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106912
20. Radbeh, Z. (2017). Nanotechnology and its application in the food industry. First Art publications. Tabriz.
21. Rahimi, Gh., Zamani, R., and Pol, M. (2013). Studying the effect of adding clay nanoparticles on the tensile and bending properties of epoxy resin system hardened with theta hardener. Publications of Tarbiat Modares University. Tehran. 14:34-29.
22. Rajaei, E. (2017). Using opopanax gum as a new source of edible film and investigation of its physical and mechanical properties. MSc thesis, College of Agriculture, Isfahan University of Technology. Isfahan.
23. Rajaei, E., and Shekarchizadeh, H. (2019). Investigation of the physical and mechanical properties of biodegradable film prepared from opopanax gum. *Journal of Food Scienc and Technology* (Iran). 16(91):323-335.
24. Ramehran, M. 2014. Application of edible films to increase food shelf life. Second National Conference on Application of Modern Technologies and Sciences of Agricultural, Natural Resources and Environment. Islamic Azad University of Meybod.
25. Salarbashi, D., Shahidi, M., and Shahabi, I. (2016). Investigation of the physicochemical and microbial properties of prepared films based on soybean flour polysaccharide containing titanium oxide nanoparticles. 4: 91-103.
26. Wen, P., Zhu, D. H., Wu, H., Zong, M. H., Jing, Y. R. and Han, S. Y. (2016). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control*. 59: 366-376. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.005
27. Yixiang, X., Ren, X., and Milford Hanna, A. 2006. Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci*. 99: 1684–1691. https://doi.org/10.1002/app.22664
28. Zhang, S., and Kawakami, K. 2010. One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition. *Int. J. Pharm.* 397: 211-217. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.007

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 467- 482

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۸۲-۴۶۷

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

Full Research Paper

Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil

Mohsen Ebrahimi Hemmati Kaykha[1], Hossein Jooyandeh[*2], Behrooz Alizadeh Behbahani[3], Mohammad Noshad[4]

Received: 2021.01.18
Revised: 2021.02.21
Accepted: 2021.04.20
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. (2022). Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 467-482.

Abstract

Introduction: Oxidative reactions are needed for human survival, but these reactions can sometimes be destructive. There is a lot of evidence that shows many disorders (neurological, renal, hepatic) and diseases such as cancer and vascular diseases, and even food spoilage are caused by oxidative reactions of free radicals. Some types of reactive oxygen species, such as oxygenated water, and free radicals such as hydroxyl and superoxide, can react with certain fats, nucleic acids, and proteins in the body to kill them. In general, any substance that delays or prevents the oxidation process is called an antioxidant. In various studies that have been done so far, the antioxidant and protective properties of the novel plants have been reported. Among other species of medicinal plants, the rosemary plant with the scientific name (*Rosmarinus officinalis* L.) belongs to the mint family, the leaves of which are used as an additive in many foods. This plant is cultivated in many parts of the world, including Iran, but the main habitat of this plant has been attributed to the shores of the Mediterranean Sea. The purpose of this study was to identify chemical compounds, antioxidant effects, total phenolic and flavonoids contents, and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil (ROEO) on colorectal cancer cell line (HT29) and identification of functional groups of ROEO using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Materials and methods: In the present study, the analysis of chemical compounds in ROEO was determined by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). The total phenolic and flavonoid content of ROEO was evaluated using Folin-Ciocalteu and colorimetry using aluminum chloride, respectively. Antioxidant properties of ROEO were evaluated by DPPH and ABTS methods. The cytotoxic effect of ROEO on colorectal cancer cell lines (HT29) was evaluated by MTT method. The compositions of the functional groups present in the essential oil were investigated using Fourier transform infrared spectroscopy.

1. MSc., 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.
4. Associate 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.2021.68369.1013

Results and discussion: The chemical analysis of ROEO comprised of 29 compounds, which composed 94.22% of total essential oil. The main compound identified in the essential oil used in this study was eucalyptol with 40.13%. Total phenolic content was 72.55 mg gallic acid per gram of essential oil and its flavonoid content was 36 mg QE/g. The ROEO antioxidant activity for both DPPH and ABTS tests were 78.74% and 81.97%, respectively. The results of cytotoxic effect of ROEO showed that the cytotoxic effect of ROEO was highly dependent on its concentration. The higher the concentration of essential oil, the higher the level of cytotoxicity. Fourier transform infrared spectroscopy analysis confirmed the presence of aldehyde compounds, ketones, carboxylic acids, esters and alkenes. The results of all ROEO tests showed that this essential oil can be used as a potential source in the pharmaceutical, food, cosmetic and health industries.

Key words: Essential oil, Gas chromatography, Fourier transform infrared spectroscopy, Free radical.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 467- 482

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۸۲-۴۶۷

مقاله علمی-پژوهشی

شناسایی ترکیبات شیمیایی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنل و فلاونوئید کل و سمیت سلولی اسانس رزماری

محسن ابراهیمی همتی کیخا[۱]- حسین جوینده[۲]*- بهروز علیزاده بهبهانی[۳]- محمد نوشاد[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۹
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۱۲/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۳۱

چکیده

رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* L. گیاهی از تیره نعناعیان می‌باشد که به دلیل داشتن خواص‌های گوناگون از جمله خواص دارویی، پزشکی و طعم‌دهنده در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. در پژوهش حاضر ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل طیف‌سنج جرمی تعیین گردید. ارزیابی محتوای تام فنلی و فلاونوئید اسانس رزماری به‌ترتیب با استفاده از روش‌های فولین- سیوکالتو و رنگ‌سنجی به کمک آلومینیوم کلراید صورت پذیرفت. ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری به دو روش DPPH و ABTS محاسبه شد. میزان اثر سمیت سلولی اسانس رزماری بر رده‌های سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات گروه‌های عاملی زیست فعال موجود در اسانس با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری شامل ۲۹ ترکیب بودند که در مجموع ۹۴/۲۲٪ از کل اسانس را شامل شدند. عمده‌ترین ترکیب شناسایی شده در اسانس رزماری ترکیب اوکالیپتول با میزان ۴۰/۱۳٪ بود. محتوای تام فنلی اسانس رزماری ۷۲/۵۵ میلی گرم گالیک اسید در گرم اسانس و میزان فلاونوئید آن برابر با ۳۶ میلی‌گرم کوئرستین اکی‌والان در گرم اسانس بود. میزان سنجش مهار رادیکال آزاد در دو روش DPPH و ABTS به‌ترتیب برابر با ۷۸/۷۴٪ و ۸۱/۹۷٪ به‌دست آمد. نتایج مربوط به میزان سمیت سلولی اسانس رزماری نشان داد که اثر سیتوتوکسیک وابستگی زیادی به غلظت داشته و با افزایش غلظت اسانس میزان سمیت سلولی نیز افزایش یافت. تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه حضور ترکیبات آلدهیدها، کتون‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و آلکن‌ها را اثبات نمود. نتایج مربوط به تمامی آزمون‌های اسانس رزماری نشان داد که این اسانس می‌تواند به عنوان یک منبع بالقوه در صنایع داروسازی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، کروماتوگرافی گازی، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، رادیکال آزاد.

مقدمه

واکنش‌های اکسایشی برای ادامه حیات انسان مورد نیاز می‌باشد، اما این واکنش‌ها در بعضی مواقع ممکن است مخرب باشند. شواهدهای بسیار زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد بسیاری از بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، بیماری‌های عروقی، اختلالات (عصبی، کلیوی، کبدی) و فساد مواد غذایی ناشی از واکنش‌های اکسایشی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Rahman, 2007, Lü et al., 2010). یکی از بزرگترین عامل مرگ و میر در میان جوامع بشری سرطان می‌باشد، اما درمان‌هایی که در حال حاضر صورت می‌پذیرد اغلب مؤثر نبوده و اثرات نامطلوب زیادی را در پی داشته است (Newman et al., 2003). بعضی از گونه های اکسیژن فعال مانند آب اکسیژنه و رادیکال‌های آزاد همانند هیدروکسیل و سوپراکسید می‌توانند با بعضی از چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های بدن وارد واکنش شوند و باعث از بین رفتن آن‌ها گردند. به‌طور کلی هر ماده‌ای که فرآیند اکسیداسیون را به تأخیر بیندازد و یا مانع ایجاد آن گردد، آنتی‌اکسیدان نام دارد (Halliwell, 2007, Halliwell, 2011). با توجه به وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در پلاسمای خون از جمله سوپر اکساید دیسموتاز و کاتالاز، اما سیستم ایمنی بدن به تنهایی قادر به حذف رادیکال‌های تولید شده در بدن

۱، ۲، ۳ و۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد، استادیار و دانشیار، 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.2021.68369.1013

نمی‌باشد، از این رو باید آنتی‌اکسیدان‌ها از منابع خارجی تأمین گردند که این نیاز نیز تنها از طریق مواد غذایی تأمین می‌شود (Young and Woodside, 2001, Collins, 2005). آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور مستقیم از تولید ذرات فعال جلوگیری می‌کنند و یا به‌صورت غیرمستقیم اثر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در بدن را تقویت می‌کنند (Khlebnikov et al., 2007). امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی به دلیل تأثیرات زیان بار، اثرات جهش‌زا و سرطان‌زایی که دارند محدود شده است. با توجه به اثبات اثرات منفی و زیان بار این افزودنی‌های شیمیایی بر سلامت جامعه، از این رو علاقه پژوهشگران به یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و بدون اثرات جانبی زیان‌آور افزایش یافته است (Shahidi et al., 2006). در کنار سایر متابولیت‌های ثانویه گیاهی، پلی‌فنول‌ها ترکیبات فعالی هستند که به مقدار زیادی در اندام های مختلف گیاهان از جمله اندام‌های هوایی آن‌ها همانند برگ، دانه و میوه آن‌ها یافت می‌شود. این متابولیت‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار زیادی در زمینه ممانعت از فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و نیتروژن از خود نشان داده‌اند. از میان مهم‌ترین ترکیبات پلی‌فنول‌ها می‌توان به ترکیباتی همانند فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی اشاره کرد (Petti et al., 2009, Di Domenico et al., 2012). با توجه به اینکه فلاونوئیدها در ساختار حلقوی خود دارای گروه‌های هیدروکسیل فنولیک می‌باشند، بنابراین این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. این ترکیبات به‌عنوان ممانعت‌کننده رادیکال‌های آزاد سوپر اکساید و اهداء کننده هیدروژن عمل می‌کند. همچنین این ترکیبات، آنزیم‌های آنتی اکسیدان‌ها را نیز فعال نموده و از تولید رادیکال‌های آزاد و آلفاتوکوفرول جلوگیری می‌نماید. محققان با توجه به پژوهش‌های که در چند دهه اخیر انجام داده‌اند، خاصیت ضدسرطانی این ترکیبات را نیز به اثبات رسانیده‌اند (Collins, 2005, Prochazkova et al., 2011, Wang et al., 2011, Di Domenico et al., 2012). ترکیبات مفید و با ارزش زیادی درگیاهان دارویی وجود دارند، از این رو گیاهان دارویی باعث افزایش کیفیت و ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی می‌گردند. در میان سایر گونه‌های گیاهان دارویی گیاه رزماری با نام علمی (*Rosmarinus officinalis* L.) از خانواده نعناعیان[1] می‌باشد. این گیاه در بسیاری از نقاط جهان از جمله ایران کشت می‌شود اما موطن اصلی این گیاه را سواحل دریای مدیترانه نسبت داده‌اند (Gaya et al., 2013, Petiwala and Johnson 2015). این گیاه در بسیاری از مواد غذایی به‌عنوان افزودنی استفاده می‌گردد. در پژوهش‌های مختلفی که تاکنون انجام شده است، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت کنندگی گیاه رزماری گزارش شده است (Gaya et al., 2013). بیشترین خواص آنتی اکسیدانی موجود در این گیاه مربوط به ترکیبات دی‌ترپن‌های فنلی می‌باشد. بیشترین دی‌ترپن‌ها موجود درگیاه رزماری که تاکنون گزارش شده است شامل اسیدکارنوزول، رزمانول، کارنوسیک، اپی‌رزمانول، ایزورزمانول می‌باشد (Gaya et al., 2013, Amaral et al., 2013, Soltani et al., 2014). هدف از این پژوهش شناسایی ترکیبات شیمیایی و گروه‌های عاملی زیست فعال، قدرت آنتی‌اکسیدانی، محتوای تام فنلی، فلاونوئید کل و اثر سمیت سلولی اسانس رزماری بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل: متانول (مرک، آلمان)، کربنات سدیم[2] (سامچون، کره)، معرف فولین سیوکالتو[3] (مرک، آلمان)، آلومینیوم تری کلراید (یونی، چم)، نیتریت سدیم[4] (سام چونگ، کره)، سود (مرک، آلمان)، الکل ۹۶٪ (ایران)، رادیکال DPPH[5] (سیگما آلدریچ، آمریکا)، گالیک اسید[6] (یونی، چم)، کوئرستین[7] (سیگما آلدریچ، آمریکا)، رادیکال کاتیون ABTS[8] (سیگما آلدریچ، آمریکا)، محیط کشت DMEM[9] (سیگما آلدریچ، آمریکا) بود.

تهیه اسانس

اسانس رزماری مورد استفاده در این پژوهش از شرکت جوهره طعم مشهد (مشهد، خراسان رضوی) خریداری گردید و در ظروف تیره رنگ دربدار و بدون تماس با نور به آزمایشگاه شیمی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل شد.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری با استفاده از GC-MS

در این پژوهش برای تجزیه ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری، از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies 7890 A، آمریکا) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی (Agilent Technologies 5975 C، آمریکا)

1 Lamiaceae
2 Na_2CO_3
3 Folin–Ciocalteu
4 Sodium nitrite
5 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
6 Gallic acid
7 Quercetin
8 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
9 Dulbecco's Modified Eagle Medium

استفاده گردید. در این روش میزان ۰/۲ میکرولیتر از اسانس رزماری به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد تا نوع و طیف ترکیبات تشکیل دهنده آن مشخص گردد. گاز حامل در این پژوهش گاز هلیم با خلوص (۹۹/۹۹٪) با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود. ستون دستگاه (Agilent Technologies Inc., HP-5 MS، آمریکا) از نوع مویینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۲۵ میکرومتر بود. در نهایت، ترکیبات متشکله اسانس رزماری در مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه الکترونی Wiley موجود در نرم‌افزار و مقایسه با اعداد استاندارد موجود درکتب و مقالات مرجع شناسایی گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2017, Alizadeh Behbahani and Fooladi., 2018).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری

بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد به روش DPPH

به‌طور کلی DPPH یک رادیکال آزاد پایدار می‌باشد که این رادیکال روی یکی از اتم‌های پل نیتروژنی خود دارای یک الکترون جفت نشده می‌باشد. در طی این روش رادیکال‌های پایدار DPPH دارای رنگ بنفش می‌باشند، که این رادیکال‌ها با عوامل کاهنده مناسب (H-A) شروع به واکنش می‌کنند و در طی این واکنش الکترون‌ها به یکدیگر متصل می‌شوند و محصول نهایی حاصل از این واکنش یک مولکول دیا مغناطیس زرد رنگ پایدار است که DPPH نامیده می‌شود. تعداد الکترون‌های از دست داده شده در طی این واکنش باعث کاهش رنگ محلول می‌شود. روش سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH در واقع بستگی به میزان توانایی آن به‌عنوان یک رادیکال آزاد پایدار در جهت رنگبری در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها است. برای انجام این آزمون ۱میلی‌لیتر از اسانس با ۳ میلی‌لیتر از محلول DPPH متانولی (۰/۱ میلی مولار)، با یکدیگر مخلوط شدند، سپس نمونه‌ها مورد نظر در یک مکان و محفظه تاریک به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. در نهایت جذب نمونه-ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل نمونه شاهد (متانول) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد (Brand- Williams et al., 1995). فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بر حسب درصد مهارکنندگی طبق رابطه ۱ محاسبه شد.

$$\text{فعالیت مهار رادیکال آزاد} = \frac{\text{نمونه جذب اسانس} - \text{نمونه جذب کنترل}}{\text{نمونه جذب کنترل}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

بررسی توانایی مهار کنندگی به روش ABTS

به‌منظور ارزیابی میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد به روش ۲ و ۲-آزینو- بیس- اتیل بنزو تیازولین- سولفونیک اسید (ABTS) از روش Shan و همکاران (۲۰۰۵) استفاده گردید. در این روش در ابتدا یک محلول آبی از ABTS به غلظت ۷ میلی‌مولار تهیه گردید، سپس محلول تهیه شده به پتاسیم پرسولفات اضافه شد تا غلظت نهایی آن ۲/۴۵ میلی‌مولار در محلول شود. محلول حاصل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) و در مکان تاریک به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شد. قبل از استفاده از کاتیون رادیکال ABTS محلول مورد نظر توسط متانول به حدی رقیق‌سازی گردید تا جذب محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر در محدوده جذبی ۰/۷ ±۰/۰۲ قرار گرفت. در نهایت ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس رزماری به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول رادیکال ABTS افزوده شد. پس از سپری شدن ۶ دقیقه محلول مورد نظر به دستگاه اسپکتروفتومتری منتقل گردید و در طول موج ۷۳۴ جذب آن قرائت و یاداشت گردید (Shan et al., 2005). درصد جذب رادیکال آزاد با استفاده از معادله ۲، محاسبه گردید.

$$\text{فعالیت مهار رادیکال آزاد} = \frac{\text{نمونه جذب اسانس} - \text{نمونه جذب کنترل}}{\text{نمونه جذب کنترل}} \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

تعیین فنل کل

میزان کل محتوای تام فنلی اسانس رزماری به کمک روش فولین-سیوکالتو مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور کلی این روش ظرفیت آنتی اکسیدانی را به‌صورت مستقیم مورد سنجش قرار نمی‌دهد، بلکه به‌طور کلی تکمیل کننده روش‌های ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. برای این منظور در ابتدا غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس رزماری با کمک الکل ۹۶٪ تهیه شد. در ادامه ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از غلظت‌های ذکر شده با ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فولین ۱۰٪ در یک لوله آزمایش با یکدیگر مخلوط شدند. سپس بعد از گذشت مدت زمان ۶ دقیقه میزان ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷٪ به ترکیب قبلی اضافه گردید. در نهایت نمونه‌های تهیه شده پس از سپری کردن مدت زمان یک ساعت به دستگاه اسپکتروفتومتری انتقال داده شد و در طول موج ۷۲۵ نانومتر جذب آن‌ها اندازگیری و اعداد آن‌ها قرائت گردید. در انتها میزان کل ترکیبات فنلی موجود در اسانس رزماری بر حسب گالیک اسید و با توجه به معادله به‌دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج آن بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم اسانس گزارش گردید (Dehghan et al., 2018).

ترکیبات فلاونوئیدی

برای سنجش محتوای فلاونوئید اسانس رزماری از روش رنگ سنجی به کمک آلومینیوم کلراید استفاده گردید. در ابتدا به ۱ میلی‌لیتر از اسانس خالص رزماری به ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵٪ اضافه شد. سپس محلول به‌دست آمده به‌مدت زمان ۶ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد، بعد از سپری شدن مدت زمان مذکور میزان ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیم کلراید ۱۰٪ به آن اضافه گردید و سپس محلول مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. پس از سپری

شدن این زمان ۱ میلی‌لیتر سود یک مولار به محلول تهیه شده اضافه گردید و در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی ماوراء بنفش خوانده شد. در این روش از کوئرستین به‌عنوان استاندارد استفاده شد. در نهایت محتوای فلاونوئید به‌صورت میلی‌گرم کوئرستین برحسب اکی‌والان گزارش شد (Haghjoo et al., 2020).

سمیت سلولی اسانس رزماری

اثر سمیت سلولی اسانس رزماری در برابر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) با استفاده از روش MTT[1] اندازه‌گیری شد. روش MTT یکی از روش‌های مرسوم و سریع برای سنجش میزان سمیت داروها می‌باشد، که اساس آن تشکیل رنگ فورمازان به دلیل احیای ترکیب MTT (دی متیل تیازول ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید) و یا دیگر نمک‌های تترازولیوم است. جهت فراهم کردن محیط کشت کامل، محیط کشت DMEM، محیط حاوی گلوکز بالا، ۱۰٪ (حجمی-حجمی) سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین و استرپتومایسین با یکدیگر مخلوط شدند، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت رطوبت ثابت ۹۵٪ و ۵٪ دی‌اکسید کربن در انکوباتور قرار داده شدند. برای انجام این آزمون از میکروپلیت استفاده گردید که در هر کدام از خانه‌ها حدود ۱۰۰ هزار سلول کشت داده شد. سپس این محیط با یک محیط کشت حاوی DMEM و سرم جنین گاوی به میزان (۲۰۰ میکرولیتر) و رقت‌های متوالی اسانس رزماری (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) جایگزین گردید. در این مطالعه چاهک حاوی سوسپانسیون سلولی فاقد اسانس به‌عنوان چاهک کنترل انتخاب گردید. پس از گرمخانه‌گذاری میکروپلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت میزان ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر کدام از چاهک‌ها افزوده گردید و مجدد میکروپلیت‌ها به‌مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. محیط رویی را به آرامی با ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید جایگزین نموده و در نهایت شدت رنگ کریستال‌های فرومازان تولید شده مورد نظر توسط دستگاه الایزا پلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت منحنی‌های زنده ماندن سلولی با توجه به سلول‌های کنترل ترسیم شد (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

طیف‌سنجی مادون قرمز اسانس رزماری

به‌طور کلی طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز برای شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی و تشخیص کیفی نوع پیوندهای مواد مختلف از جمله اسانس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش دستگاه مورد استفاده برای این آنالیز ساخت شرکت (Perkin Elmer Co., MA, USA) در محدوده طول موج cm^{-1} ۴۵۰-۴۰۰۰ رسم گردید (Sampaio et al., 2012, Rodrigues et al., 2015).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های این پژوهش به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی ترکیبت شیمیایی اسانس رزماری

یافته‌های حاصل از شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی در جدول ۱، آورده شده است. در شکل ۱، اعداد درج شده در ستون افقی کروماتوگرام، نشانگر مدت زمان جداسازی و شناسایی هریک از ترکیبات موجود در اسانس رزماری و اعداد درج شده در ستون عمودی میزان فراوانی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس رزماری را نشان می‌دهد. در این پژوهش، ۲۹ ترکیب موجود در اسانس رزماری شناسایی شدند که در مجموع، ۹۴/۲۲٪ از ترکیبات موجود در اسانس را تشکیل می‌دادند. عمده‌ترین ترکیب موجود در اسانس رزماری مورد استفاده در این پژوهش اوکالیپتول یا (۱و ۸- سینئول) به میزان ۴۰/۱۳٪ بود. سایر ترکیبات غالب موجود در اسانس رزماری شامل: گاماتروپنن (۱۳/۶۷٪)، آلفا ترپینن (۱۱/۴۲٪) و ایزوپروپیل میریستات (۷/۴۷٪) بود. Melka Abdo و همکاران (۲۰۱۸)، خصوصیات شیمیایی و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی ارقام مختلف اسانس رزماری را در کشور اتیوپی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که که عمده‌ترین ترکیبات موجود در ارقام مختلف اسانس رزماری به شرح ذیل می‌باشد: در اسانس رزماری شماره ۰۱ بیشترین ترکیبات مربوط به اوکالیپتول (۲۲/۲۵٪)، آلفا- پینن (۲۰/۳۹٪) و کامفور (۸/۰۴٪)، در اسانس رزماری شماره ۰۲ بیشترین ترکیبات مربوط به اوکالیپتول (۲۱/۴۶٪)، آلفا- پینن (۱۷/۲۷٪) و وربنون (۱۳/۶۵٪) و در اسانس رزماری شماره ۰۳ بیشترین ترکیبات مربوط به اوکالیپتول(۲۱/۴۶٪)، آلفا- پینن (۱۷/۲۷٪) و اندو-بورنئول (۹/۰۹٪) بود. همچنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ارقام بر اساس IC_{50} در حدود ۴۵۷/۰۱ تا ۵۸۹/۶۸ بوده است (Melka Abdo

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

et al., 2018). Jafarzadeh Khaledi و همکاران (۲۰۱۰)، اثر اسانس رزماری روی روند رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در سوپ آماده تجارتی را مورد بررسی قرار دادند. بیشترین ترکیبات شناسایی شده موجود در پژوهش آن‌ها مربوط به ترکیب وربنون به میزان ۱۱/۴۲٪ بود (Jafarzadeh Khaledi et al., 2010). Jalali-Heravi و همکاران (۲۰۱۱)، اسانس رزماری ایرانی را با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به‌طیف‌سنجی جرمی همراه با کمومتریکس را مورد تجزیه و تحلیل اسانس قرار دادند (Jalali-Heravi et al., 2011). بیشترین ترکیبات موجود در اسانس رزماری ایرانی مربوط به ترکیبات ۱و ۸- سینئول (۲۳/۴۷٪)، آلفا پینن (۲۱/۷۴٪)، بربونون (۷/۵۷٪) و کامفور (۷/۲۱) می‌باشد. Roomiani و همکاران (۲۰۱۶)، در طی پژوهشی بیان نمودن که بیشترین ترکیبات موجود در اسانس رزماری مربوط به ترکیبات آلفا پینن (۱۹٪)، ۱ و ۸- سینئول (۹/۰۵٪)، کامفور (۸/۵۰٪) و کامفن (۶/۴۳٪) بودند (Roomiani et al., 2016).

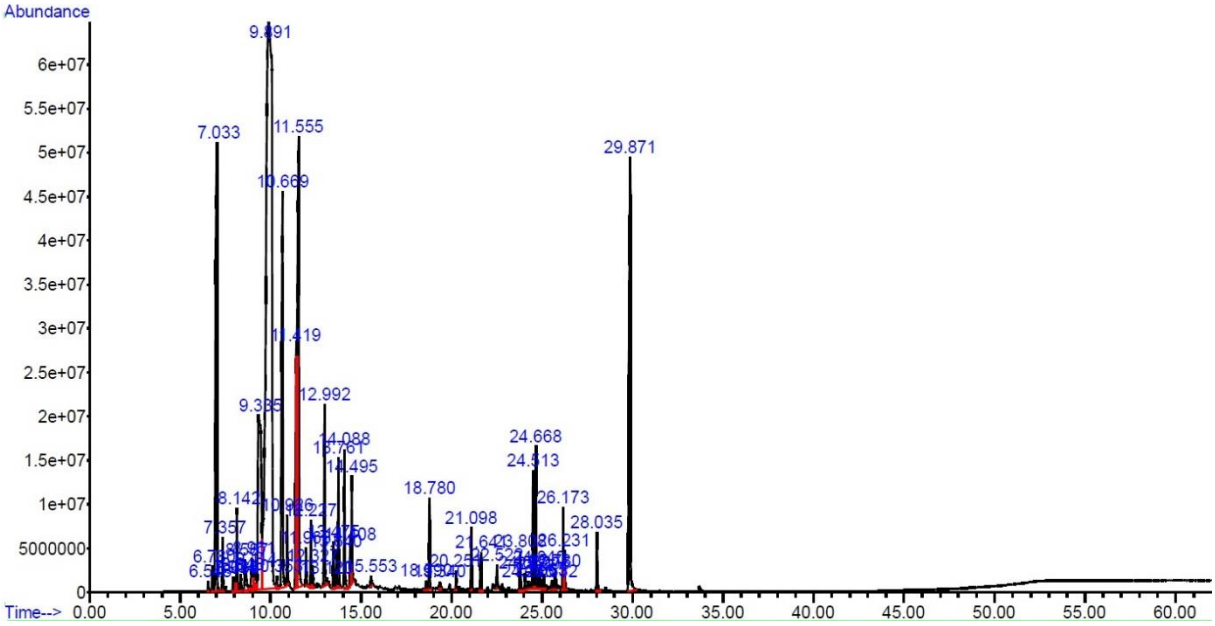
جدول ۱- شناسایی ترکیبات اسانس رزماری با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی

Table 1. Composition of Rosmarinus officinalis essential oil determined by GC–MS.

زمان بازداری (دقیقه) Retention Time (min)	%	ترکیبات شناسایی شده Detected compounds	ردیف Row
6.54	0.8	β.-Pinene	1
8.06	0.12	Sabinene	2
8.58	0.61	β.-Myrcene	3
8.96	0.72	α.-Phellandrene	4
9.99	40.13	Eucalyptol	5
10.67	13.67	γ.-Terpinene	6
11.42	0.15	α.-Terpinolene	7
11.42	11.42	α.-Terpinene	8
11.97	0.32	Butanoic acid	9
12.22	0.74	Bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol	10
12.32	7.5	Carene	11
13.47	0.38	Isoborneol	12
13.64	0.35	Pinocarvone	13
13.76	1.23	endo-Borneol	14
14.40	0.43	trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	15
14.49	1	1 L-.alpha.-Terpineol	16
18.78	1.19	Camphene	17
20.25	0.15	Longifolene	18
21.09	0.52	Aromandendrene	19
21.64	0.52	1Alloaromadendrene	20
22.52	0.24	Bicyclogermacrene	21
23.80	0.37	Cyclohexanemethanol,	22
24.06	0.16	Epiglobulol	23
24.06	1.33	Globulol	24
24.51	1.11	Spathulenol	25
24.84	0.23	Ledol	26
25.73	0.25	γ.-Eudesmol	27
26.23	1.21	Naphthalenemethanol,	28
29.87	7.47	Isopropyl myristate	29
	94.22		**کل Total**

Alipour و همکاران (۲۰۱۹)، با مطالعه‌ای روی اسانس رزماری بیان نمودند که بیشترین ترکیبات موجود در اسانس مورد پژوهش آن‌ها به‌ترتیب مربوط به آلفا پینن و ۱ و ۸- سینئول با درصدهای ۲۶/۱۲ و ۹/۵۵ بودند (Alipour et al., 2019). Jianga و همکاران (۲۰۱۱)، ترکیب شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس رزماری را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین ترکیبات اسانس رزماری مورد استفاده در پژوهش آن‌ها ۱ و۸- سینئول (۲۶/۵۴٪) بود (Jianga et al., 2011). Malakootian و همکاران (۲۰۱۳)، در طی مطالعه‌ای ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری را مورد بررسی قرار دادند. در آنالیز اسانس رزماری ۲۰ ترکیب شناسایی گردید که ۸۲/۰۹٪

از این ترکیبات شامل ۱و ۸- سینئول، آلفاپینن، وربنون، کامفور، بربونون و لیمونن بود (Malakootian et al., 2013). Kivanc و همکاران (۱۹۹۸)، گزارش دادند که فعال‌ترین اجزای اسانس‌ها فنل‌ها و متعاقب آن آلدهید و کتون بودند. همچنین آن‌ها بیان نمودند یکی از ترکیبات اصلی اسانس رزماری ۱و ۸- سینئول است (Kivanc et al., 1998).



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس رزماری.

Fig. 1. Chromatogram of Rosmarinus officinalis essential oil.

فنل کل اسانس رزماری

میزان محتوای تام فنلی اسانس رزماری با روش فولین- سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت. در این روش مقدار جذب اسانس رزماری با مقدار جذب اسید گالیک مقایسه گردید. میزان محتوای تام فنلی اسانس رزماری مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲، بیان شده است. Selmi و همکاران (۲۰۱۷)، در پژوهشی خود میزان محتوای تام فنلی اسانس رزماری را به‌ترتیب ۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (Selmi et al., 2017). Alvarez و همکاران (۲۰۱۹)، در پژوهش خود میزان فنل کل اسانس رزماری ۰/۷ ±۸/۹ میلی گرم بر میلی‌لیتر بیان نمودند (Alvarez et al., 2019). Jamshidi و همکاران (۲۰۰۹)، در طی مطالعه‌ای ترکیبات فنلی چند گونه گیاهی بومی مازندران را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی آن‌ها نشان داد که میزان گیاه رزماری به‌ترتیب برابر با ۵۹/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (Jamshidi et al., 2009). Bubonja-Sonje و همکاران (۲۰۱۱)، در پژوهشی میزان محتوای تام فنلی عصاره رزماری را به ۴۵۰ میلی‌گرم برگرم گزارش کردند (Bubonja-Sonje et al., 2011). Hendel و همکاران (۲۰۱۶)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری و اثر مهاری آن بر *پنیسیلیوم دیگیتاتوم* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان داد میزان فنل موجود در عصاره رزماری مورد پژوهش برابر با ۱۲۹ میلی‌گرم بر گرم گالیک اسید بود (Hendel et al., 2016). Santos و همکاران (۲۰۱۲) اعلام نمود ماهیت فیزیکوشیمیایی فنل‌های فرد موجود در عصاره‌ها و اسانس‌ها ممکن است در کمک به فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به کل فنلی کل اهمیت بیشتری داشته باشد (Santos et al., 2012). Moreno و همکاران (۲۰۰۶) و Wojdyło و همکاران (۲۰۰۷)، در پژوهش‌های جداگانه میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره رزماری را پایین گزارش نمودند (Moreno et al., 2007; Wojdyło et al., 2007). از آنجایی که گیاهان با ارزشمندترین منابع ترکیبات فنلی مانند اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها و تانن‌ها می‌باشند، بنابراین از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نیز به شمار می‌روند. با توجه به اینکه آنتی‌اکسیدان‌های موجود در مواد غذایی بدن انسان را در مقابل استرس اکسیداتیو حفظ می‌نماید از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند. مطالعات بسیاری در زمینه خواص آنتی‌اکسیدانی انجام پذیرفته است (Jamshidi et al., 2010, Pourmorad et al., 2006). همانطور که در جدول ۲، نشان داده شده است با توجه به میزان بالای فنل کل و میزان بالای فعالیت آنتی اکسیدانی موجود در اسانس رزماری مورد استفاده پیش‌بینی می‌شود این دو ترکیب با یکدیگر ارتباط مستقیمی دارند. نتایج حاصل از سایر پژوهش‌های محققین نیز نشان داده است، گیاهانی که دارای ترکیبات

فنلی بالاتری می‌باشند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز دارند (Jamshidi et al., 2010, Pourmorad et al., 2006). از سوی دیگر با توجه به اینکه ترکیبات فنلی به صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شود و دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز می‌باشند، بنابراین به‌طور مؤثری به‌عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده، لذا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و مؤثر عمل می‌کنند.

میزان فلاونوئید کل اسانس رزماری

میزان ترکیبات فلاونوئید کل موجود در اسانس رزماری با استفاده از معرف آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان فلاونوئید موجود در اسانس رزماری برابر با ۳۶ میلی‌گرم کوئرستین اکی‌والان در گرم اسانس بود که در جدول ۲، نشان داده شده است. Selmi و همکاران (۲۰۱۷)، میزان فلاونوئیدی اسانس رزماری را برابر با ۲/۹۷ ±۱۴/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (Selmi et al., 2017). Jamshidi و همکاران (۲۰۰۹)، در بررسی‌های خود، روی گیاه رزماری میزان فعالیت فلاونوئیدی آن را ۱۳۰/۷۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان نمودند (Jamshidi et al., 2009). Yesil-Celiktas و همکاران (۲۰۰۷ b)، میزان فلاونوئید موجود در عصاره رزماری را بین ۳۴/۱ تا ۱۴۷/۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره را صرف نظر از زمان جمع‌آوری را گزارش دادند (Yesil-Celiktas et al., 2007). Yesil-Celiktas و همکاران (۲۰۰۷)، در پژوهش دیگری بیان نمودند که ترکیبات موجود در عصاره رزماری با توجه به نوع عصاره، محل و زمان برداشت تغییر می‌یابد، بنابراین میزان ترکیبات موجود در عصاره‌ها جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی و در زمان‌های مختلف به میزان قابل توجهی با یکدیگر تفاوت دارند (Yesil-Celiktas et al., 2007). Hendel و همکاران (۲۰۱۶)، در پژوهش خود میزان فلاونوئید موجود در عصاره رزماری را ۳۸ میلی‌گرم معادل کوئرستین/ گرم عصاره خشک ذکر نمودند (Hendel et al., 2016).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری

در طی فرآیند DPPH آنتی‌اکسیدان‌ها با رادیکال‌های آزاد DPPH واکنش می‌دهند که در نتیجه آن را کم رنگ یا بی‌رنگ می‌نمایند. هر چقدر میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه بیشتر باشد میزان کاهش رنگ آن نیز بیشتر است، بنابراین میزان کاهش رنگ با قدرت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم دارد (Kamkar et al., 2010). نتایج مربوط به مهار رادیکال آزاد به روش DPPH در جدول ۲، ذکر شده است. در این روش میزان مهار رادیکال آزاد ۷۸/۷۴٪ به دست آمد. Erkan و همکاران (۲۰۰۸)، همچنین آن‌ها در طی پژوهشی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری، اسانس سیاه دانه، کارنوسیک اسید، رزمارینیک اسید و سساموِل را مورد بررسی قرار دادند. همچنین آن‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی رزماری را به ترکیبات فنولیک که شامل کارنوزول، کارنوزیک اسید، رزمارینیک اسید و رزمانول می‌باشد نسبت دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری به روش مهار رادیکال آزاد DPPH، ۱/۴ ±۵۴ درصد بوده است (Erkan et al., 2008). Mohammadi (۲۰۱۵)، بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و اتانولی گیاه رزماری، مریم گلی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان های سنتزی BHT و TBHQ در روغن ماهی را مورد مطالعه قرار داد. نتایج حاصل از پژوهش آن نشان داد که درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، عصاره متانولی و اتانولی گیاه رزماری به‌ترتیب ۱۸/۱۲ و ۲۸/۸۴ میکروگرم بر میلی‌گرم برحسب IC_{50} بود (Mohammadi et al., 2015). Alizadeh و همکاران (۲۰۱۴) بررسی اثرات آنتی-اکسیدانی عصاره رزماری و چویر در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ بر روند اکسیداسیون روغن حین فرآیند سرخ کردن عمیق را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که عصاره رزماری دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره چویر می‌باشد (Alizadeh et al., 2014). Selmi و همکاران (۲۰۱۷)، در طی پژوهشی بیان نمودند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری ۴/۲۷ ±۲۲۱/۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} گزارش کردند کردند (Selmi et al., 2017). Alvarez و همکاران (۲۰۱۹)، اثرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و حسی اسانس‌های پونه کوهی و رزماری را روی گل کلم بروکلی مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری را ۳۹/۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر بیان نمودند (Alvarez et al., 2019). Fernandez و همکاران (۲۰۰۵)، در طی پژوهشی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی-باکتریایی عصاره‌های رزماری، پرتقال و لیمو را در گوشت پخته مورد مطالعه و مقایسه قرار دادند. مطالعه حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که در میان عصاره‌ها مورد پژوهش، عصاره رزماری فعالیت آنتی-اکسیدانی بیشتری نسبت به باقی عصاره‌ها دارد (Fernandez et al., 2005). Jamshidi و همکاران (۲۰۰۹)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی چند گونه گیاهی بومی مازندران را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی آن‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری برابر با ۴۲/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (Jamshidi et al., 2009).

در آزمون تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس به روش ABTS رادیکال کاتیون‌های ABTS با آنتی‌اکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های رادیکالی موجود در اسانس که دهنده هیدروژن می‌باشند، واکنش می دهند که به شکل کاهش یافته در می‌آیند در نهایت برای تعیین میزان این کاهش، با جذب آن‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر، می‌توان به درصد بازدارندگی آنتی‌اکسیدانی پی‌برد (Esmaeli et al., 2017). نتایج

مربوط به تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری به روش ABTS در جدول ۲، نشان داده شده است. Erkan و همکاران (۲۰۰۸)، فعالیت های آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری، اسانس سیاه دانه[1]، کارنوسیک اسید، رزمارینیک اسید و سساموِل را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ABTS در سه بازه زمانی مختلف (۱، ۴ و ۶ دقیقه)، به‌ترتیب برابربا ۱/۱ ±۱۵/۵، ۱/۱ ±۱۵/۶ و ۱/۰ ±۱۵/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} بوده است (Erkan et al., 2008). Kanth و همکاران (۲۰۱۸)، در طی مطالعه‌ای فعالیت ضدمیکروبی، آنتی‌بیوفیلم و پتانسیل آنتی-اکسیدانی اسانس رزماری را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری اندازه‌گیری شده توسط این روش را ۴۴/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر حسب IC_{50} بیان نمودند (Kanth et al., 2018). Rababah و همکاران (۲۰۰۴)، اشاره نمودند فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری می‌تواند ناشی از ترکیبات فنلی کارنوزول، اسید کارنوزی، رزمارنیک اسید، روزمانول موجود در عصاره باشد (Rababah et al., 2004).

جدول۲- نتایج آزمون¬های شیمیایی اسانس رزماری.

Table 2- Result of chemical analysis of Rosmarinus officinalis essential oil

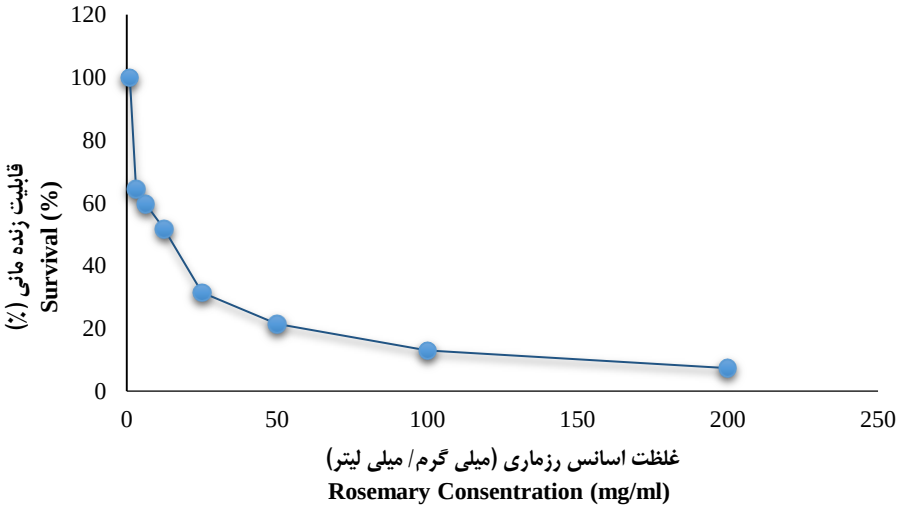
آزمون شیمیایی Chemical analysis	نتایج Result
(٪) DPPH	78.74±1.06
(٪) ABTS	81.97±0.58
فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید اکی‌والان/ گرم اسانس) Total phenol (mg of galic acid equivalent /g essential oil)	72.55±0.45
فلاوونوئید (میلی‌گرم کوئروستین اکی‌والان) Flavonoid (mg quercetin equivalent)	36.00±0.50

ارزیابی نتایج سمیت سلولی اسانس رزماری

از روش MTT به‌منظور بررسی اثرات سمیت سلولی اسانس با توجه به سادگی آن استفاده می‌گردد. در این پژوهش میزان سمیت سلولی اسانس رزماری توسط روش MTT در غلظت‌های (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی لیتر) بر رده‌های سلولی HT29 صورت پذیرفت. شکل ۲ میزان اثر سمیت سلولی اسانس رزماری بر رده‌های سلولی HT29 پس از ۲۴ ساعت واکنش نشان می‌دهد. میزان سمیت سلولی وابسته به غلظت اسانس رزماری بود. هرچه میزان غلظت اسانس بالاتر بود میزان سمیت سلولی نیز افزایش می‌یافت. در شکل ۲، نشان داده شده است که بیشترین درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های پایین‌تر به‌ویژه در غلظت ۳/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و هر چقدر میزان غلظت اسانس افزایش می‌یافت (به‌ویژه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، زنده ماندن سلول‌ها نیز نسبتاً کاهش پیدا کرده است. به‌طور کلی می‌توان با داده‌های MTT تأیید کرد که غلظت کم اسانس رزماری می‌تواند تکثیر سلولی را به میزان قابل توجهی تحریک کند ($P < 0.05$). Asanova و همکاران (۲۰۰۳)، نشان داد که این جزء از اسانس رزماری از نظر سمیت بسیار قوی و عملکرد ضدسرطانی دارد. این امکان وجود دارد که این مؤلفه نقش مهمی در سمیت سلولی این اسانس داشته باشد (Asanova et al., 2003). ۱ و ۸ – سینئول اثر سمی قوی بر سلول های یوکاریوت‌ها دارد (Obeng-Ofori et al., 1997, Santos et al, 2004). با توجه به اینکه اسانس رزماری علاوه بر سمیت سلولی بالا ممکن است دارای پتانسیل ضدتومور و سموم دفع آفات را نیز داشته باشد. فرض بر این است که مونوترپن‌های اکسیژن‌دار اسانس دارای درجه متفاوتی از سمیت سلولی هستند. این ماده به‌عنوان یک ماده لیپوفیلی معمولی، از دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسم عبور کرده و ساختار سلول‌ها را مختل می‌کند (Faixovà and Faix., 2008). فعالیت ضد تکثیر یا سمیت سلولی ترکیبات و عصاره‌های مختلف رزماری بر رده‌های سلولی مختلف سرطان از جمله سرطان خون، پروستات، پستان، پوست و روده بزرگ قبلاً گزارش شده است (Yesil-Celiktas et al., 2010, NGO et al., 2011, Johnson., 2011, Einbond et al., 2012, Kar et al., 2012). Mohammadi و Hoveizi (۲۰۱۷)، تأثیر عصاره هیدروالکلی رزماری را بر سلول‌های سرطانی سر و گردن رده HN5 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که اسانس رزماری باعث کاهش بقای سلول های سرطانی گردید (Mohammadi and Hoveizi, 2017). Melka Abdo و همکاران (۲۰۱۷)، اثر ضدسرطانی عصاره گیاه رزماری بر

1 *Nigella sativa* L.

سلول‌های سرطانی رده MCF-7، SKBR-3 و سلول‌های فیبروبلاست HUP02 را مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها که اسانس رزماری بر رده‌های سلول‌های سرطانی MCF-7، SKBR-3 اثر ضدسرطانی داشت اما بر سلول‌های فیبروبلاست HUP02 فاقد اثر ضدسرطانی بود. در پژوهش‌های زیادی نشان داده شده است که عصاره رزماری بقاء سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهد که به صورت افزایش آپوپتوز و مرگ سلولی گزارش شده است (Melka Abdo et al., 2018). تیمار سلول‌های سرطانی کولون، پانکراس، پستان و ریه با عصاره رزماری باعث افزایش کلیواژ پلی ADP ریبوز پلیمراز (PARP)می‌شود که نشان‌دهنده افزایش آپوپتوز است (Moore et al., 2006).

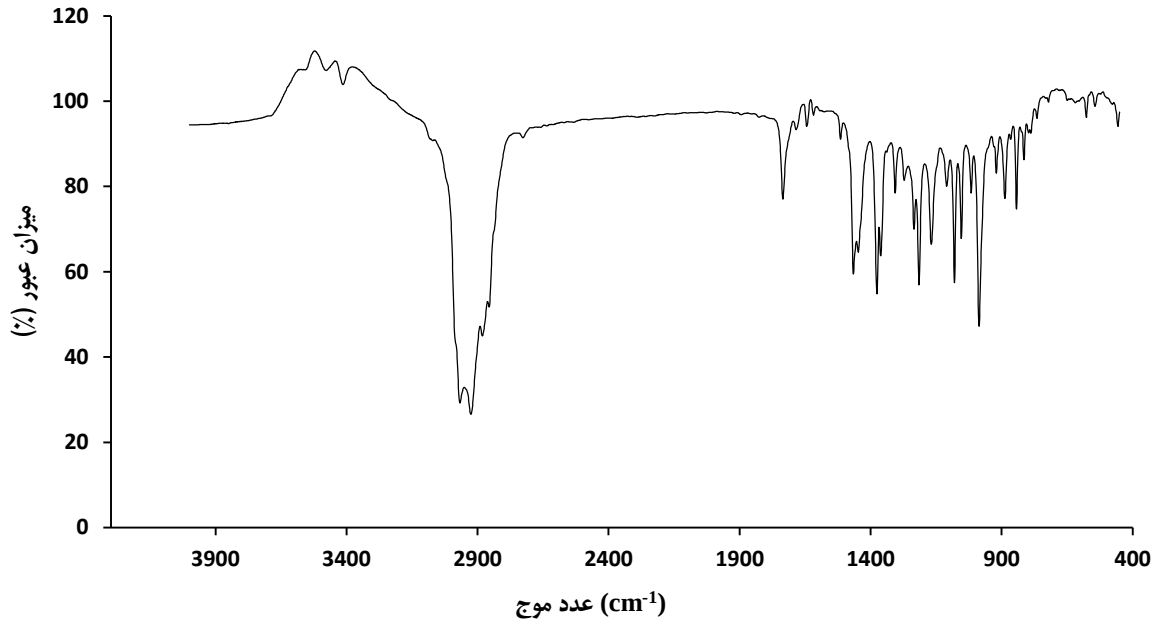


شکل ۲- اثر سمیت غلظت‌های مختلف اسانس رزماری بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT29) پس از ٢٤ ساعت.

Fig. 2. Cytotoxic effect of various concentrations of Rosmarinus officinalis essential oil on survival of HT29 cell line after 24 h.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه اسانس رزماری

نتایج مربوط به طیف‌سنجی مادون قرمز اسانس رزماری در ناحیه ۴۵۰cm^{-1} –۴۰۰۰ در دمای محیط (۲۰ درجه سانتی‌گراد) در شکل ۳، نشان داده شده است. پیک‌های موجود در ناحیه ۳۰۰۰ –۳۵۰۰ cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل (O-H) که ممکن است مربوط به گروه‌های الکلی یا اسیدهای کربوکسیلیک باشد. محدوده بین ۲۸۰۰ –۳۰۰۰ cm^{-1} به ویژه پیک‌های مربوط به ناحیه ۲۹۶۷ تا ۲۹۲۵/۳۳ cm^{-1} مربوط به حالت‌های کششی پیوندهای C-H گروه‌های متیل (CH_3) می‌باشد. که این پیک‌ها مربوط به ترکیبات الکلی موجود در اسانس می‌باشد (Cui et al., 2007, Kak et al., 2016). وجود پیک در طول موج ۱۷۳۴/۷۱cm^{-1} نشان‌دهنده پیوندهای کتونی (C=O) می‌باشد که می‌تواند مربوط به ترکیباتی همچون آلدهیدها، کتون‌ها ، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و آلکن‌ها باشد. وجود پیک در طول موج ۱۴۶۵/۷۸ cm^{-1} –۱۳۷۵/۵۲نشان‌دهنده گروه‌های (CH_2 و CH_3) می‌باشد. وجود پیک در ناحیه ۱۳۰۶ –۱۳۶۱ cm^{-1} مربوط به پیوندهای (NO_2) و ترکیبات نیترو می‌باشد. پیک‌های موجود در ناحیه ۱۲۱۵ –۱۲۳۴ cm^{-1} به‌ترتیب مربوط به پیوندهای C-OH و C-O-H می‌باشد. وجود پیک در طول موج ۱۱۵۰ –۹۵۰ cm^{-1} مربوط به ارتعاشات (C-O و C-O-C) می‌باشد (Kacurakova et al, 2000). ناحیه بین ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ ناحیه اثر انگشت نامیده می‌شود (Naji Tabasi and Razavi., 2016). نتایج حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز این پژوهش با نتایج Hameed و همکاران (۲۰۱۵) مشابهت زیادی داشت.



شکل۳- طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) اسانس رزماری.
Fig. 3. FT-IR spectra of *Rosmarinus officinalis* essential oil.

نتیجه‌گیری

نتایج مربوط به آزمون‌های شیمیایی (فنول کل، فلاونوئید و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی) اسانس رزماری نشان داد که این اسانس می‌تواند به‌عنوان یک منبع بالقوه در صنعت داروسازی و تولیدات غذایی مورد استفاده قرار گیرد، آزمون شناسایی ترکیبات شیمیایی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی نشان داد بیشترین ترکیب موجود در اسانس رزماری مربوط به اوکالیپتول به میزان ۴۰/۱۳٪ بود. نتایج سمیت سلولی اسانس رزماری نشان داد که اثر سیتوتوکسیک اسانس رزماری وابستگی زیادی به غلظت آن دارد. تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز اسانس رزماری حضور ترکیبات آلدهیدها، کتون‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و آلکن‌ها را در این اسانس به اثبات رساند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه 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. Alipour, M., Jamal Saharkhiz, M., Niakousari, M. & Seidi Damyeh, M., (2019). Phytotoxicity of encapsulated essential oil of rosemary on germination and morphophysiological features of amaranth and radish seedlings. *Scientia Horticulturae*, 243, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.055
2. Alizadeh Behbahani, B. & Imani Fooladi, A. A., (2018). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 114, 299-303. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.055
3. 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. *Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.
4. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Tabataba 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, 515-26. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.055

5. Alizadeh, L., Nayebzadeh, K., & Shahin, R., (2014). Antioxidant effect of rosemary and ferulago extracts and synthetic TBHQ on oil oxidation during deep-frying. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(4), 135-143. [In Persian].
6. Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A. & Ayala-Zavala, J. F., (2019). Antimicrobial, antioxidant, and sensorial impacts of oregano and rosemary essential oils over broccoli florets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13889, 2-10.
7. Amaral, G. P., deCarvalho, N. R., Barcelos, R. P., Dobrachinski, F., de Lima Portella, R., da Silva, M. H., Lugokenski, T. H., Mundstock Dias, GR., da Luz, S. C. A., Boligon, A. A., Athayde, ML., Villetti, M. A., Soares, F. A. A. & Fachinetto, R., (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats, *Food and chemical toxicology*, 55, 48-55.
8. Asanova, Zh. K., Suleimenov, E. M., Atazhanova, G. A., Dembitskii, A. D., Pak, R. N., Dar, A. & Adekenov, S. M., (2003). Biological activity of 1, 8-cineole from levant wormwood. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37 (1), 28-30.
9. 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
10. Bubonja-Sonje, M., Jasminka Giacometti, J. & Abram, M., (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821–1827. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.071
11. Collins, A. R., (2005). Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1923- 1930. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.06.004
12. Cui, S. W., Phillips, G. O., Blackwell, B., & Nikiforuk, J., (2007). Characterisation andproperties 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.
13. Dehghan N., Barzegar, H., Mehrnia, M. A., & Jooyandeh, H. 2018. Investigation on the effect of methanolic Bene (P*istachia atlantica*) hull extract on oxidative stability of soybean oil. *Innovative Food Technologies*, 5(3), 499-507. [In Persian].
14. Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R. & Perluigi, M., (2012). Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(5), 737-747. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.005
15. Einbond, L. S., Wu, H. A., Kashiwazaki, R., He, K., Roller, M., Su, T., Wang, X. & Goldsberry, S., (2012). Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia*, 83, 1160-1168.
16. Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E., (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110, 76–82. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.058
17. Esmaeli, F., Tajik, H., Mehdizadeh T., & Mayeli, M., (2017). Determination and comparison of antioxidant activity and phenolic content of *Pimpinella affinis* hydroethanolic extract and essential oil. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences*, 28(5), 311-320. [In Persian].
18. Faixovà, Z. & Faix, S., (2008). Biological effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil. *Folia Veterinaria*, 52(3-4), 135-139.
19. Fernandez, J., Zhi, N., Aleson, L., Perez, J. A. & Kuri, V., (2005). Antioxidant and antibacterial activites of natural extracts: application in the beef meat balls. *Meat Science*, 69, 371–380. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.004
20. Gaya, M., Repetto, V., Toneatto, J., Anesini, C., Piwien-Pilipuk, G. & Moreno, S., (2013). Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in Rosmarinus officinalis, is exerted through the C/EBPs and PPARγ pathways at the onset of the differentiation program Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1830(6), 3796- 3806. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.021
21. Haghjoo, L., Barzegar, H., & Jooyandeh, H., (2020). The effect of different drying methods on chemical composition and antioxidant properties of methanolic extract of olive leaf. *Journal of food Science and Technology (Iran)*, 16(97), 149-159. [In Persian].
22. Halliwell, B., (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(pt5), 1147-1150.
23. Halliwell, B., (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125-30. https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002
24. Hameed, I. H., Ibraheam, I. A. & Kadhim, H. J., (2015). Gas chromatography mass spectrum and fouriertransform infrared spectroscopy analysis of methanolic extract of *Rosmarinus oficinalis* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(6), 90-106.

25. Hendel, N., Larous, L. & Belbey, L., (2016). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. *International Food Research Journal*, 23(4), 1725-1732.
26. Jafarzadeh Khaledi, K., Aghazadeh Meshgi, M., Sharifan, A., & Larijani, K., (2010). Investigation of effect of the Rosemary essential oil on growth of *Staphylococcus aureus* in commercial instant soup. *Journal of Comparative Pathobiology*, 7(2), 255-264. [In Persian].
27. Jalali-Heravi, M., Sadat Moazenia, R. & Sereshtib, H., (2011). Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Chromatography*, 1218, 2569–2576. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.048
28. Jamshidi, M., Ashtiani, H. R., Rezazade, S. H., Fathiazad, F., Mazandarani, M. & Khaki, A. (2010). Evaluation and Comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some plant species in mazandaran. *Journal of Medicinal Plants*, 34(2), 177-183.
29. Jamshidi, R., Afzali, Z. & Afzali, D., (2009). Chemical composition of hydrodistillation essential oil of Rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 5 (1), 78-81.
30. Jianga, Y., Wua, N., Jie Fua, Y., Wanga, W., Luoa, M., & Jian Zhaoa, C. H., (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32: 63–68. https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011
31. Johnson, J. J. (2011). Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. Cancer Letters 2011; 305: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.02.005
32. Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N. & Ebringerova, A., (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195-203. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X
33. Kak, M., 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.
34. Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A. H., & Mohammadian, M., (2010). Study of antioxidant functional of the water, methanol, and ethanol extracts of Endemic *Cuminum cyminum* L. and *Cardaria draba* L. in the In-vitro Systems. *Internal Medicine Today*, 16(3), 37-45. [In Persian].
35. Kanth, M. K., Mehta, N., Chatli, M. K., Malav, O. P., Kumar, P., Wagh, R. V. & Panwar, H., (2018). In-vitro Assessment of Antimicrobial, Antibiofilm and Antioxidant Potential of Essential Oil from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Animal Research*, 8 (6), 989-998.
36. Kar, S., Palit, S., Ball, WB. & Das, PK., 2012. Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF-kB signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Apoptosis*, 17, 735-747. https://doi.org/10.1007/s10495-012-0715-4
37. Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N. & Quinn, MT., (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749-1770. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.037
38. Kivanc, M. & Akgül, A., (1998). Effect of some essential oil components on the growth of foodborne bacteria and synergism with some food ingredients. *Flavor and Fragrance Journal*, 3, 95-98. https://doi.org/10.1002/ffj.2730030209
39. Lü, J. M., Lin, P. H., Yao Q. & Chen, C., (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840- 860. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x
40. Malakootian, M., & Hatami, B., (2013). Survey of chemical composition and antibacterial activity of *Rosmarinus Officinalis* Essential oils on *Escherichia Coli* and Its Kinetic. *The Journal of Toloo-e-behdasht*, 12(1), 1-13. [In Persian].
41. Melka Abdo, B., Asaminew, G., Mieso, B. & Sisay W., (2018). Chemotypic Characterization and Antioxidant Activities of *Rosemarinus officinalis* Essential Oil from Ethiopian Cultivars. *Medicinal and Aromatic Plants* 7(6), 1-4.
42. Mohammadi, A. R., (2015). Antioxidant effect of methanolic and ethanolic extracts of Salvia officinalis and Rosmarinus officinalis as compare with synthetic antioxidants TBHQ and BHT in oil fish. *MSc. Dissertation*, Islamic Azad University, *Pharmaceutical Sciences Branch*. [In Persian].
43. Mohammadi, T., & Hoveizi, E., (2017). Comparison of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) hydroalcoholic extract on the viability of head and neck cancer cells Line HN5 and neuronal progenitor cells of Mouse. *Quarterly Journal of Developmental Biology*, 9(3), 13-22. [In Persian].

44. Moore, J., Megaly, M., Macneil, A. J., Klentrou, P. & Tsiani, E., (2016). Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 83,725-32. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.043
45. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S. & Vojnov, A. A., (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40, 223-231.
46. Naji Tabasi, S. & Razavi, S. M. A., 2016. New studies on basil (*Ocimum bacilicum* L.) seed gum: Part 2– Emulsifying and foaming characterization. *Carbohydrate Polymers*, 149, 140-150. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.088
47. Newman, D. J., Cragg ,G. M. & Snader, K. M., (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022- 1037.
48. NGO, S. N. T., Williams, D. B. & Head, R. J., (2011). Rosemary and cancer prevention: Preclinical perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 946-954.
49. Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C. H., Bekele, J. & Hassanali, A., (1997). Biological activity of 1, 8- cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyese* (ayobagira) against stored products beetles. *Journal of Applied Entomolog*, 121 (2), 237-243. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1997.tb01399.x
50. Petiwala, S. M. & Johnson, J. J., (2015). Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer letters*, 367(2), 93-102. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.005
51. Petti, S. & Scully, C., (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, 37, 413-423. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.003
52. Pourmorad, F., Hosseinmehr, S. J. & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some slected Iranian medicinal plants. *Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
53. Prochazkova, D., Bousova, I. & Wilhelmová N., (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513- 523. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018
54. Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S. & Horax. R., (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-Butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5183-5186. https://doi.org/10.1021/jf049645z
55. Rahman, K., (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.
56. Rodrigues, S. E., Machado, A. E. H., Berardi, M., Ito, AS., Almeida, L. M., Santana, M. J. Liao, L. M., (2015). Investigation of protonation effects on the electronic and structural properties of halogenated sulfonated porphyrins. *Journal of Molecular Structure*, 1084, 284–293. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.12.053
57. Roomiani, L., Soltani, M., & Akhondzadeh Basti, A., (2016). Effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil and nisin on Log P% of *Streptococcus iniae* in BHI broth. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 10(1), 35-43. [In Persian].
58. Sampaio, R. N., Gomes, W. R., Araujo, D. M. S., Machado, A. E. H., Silva, R. A., Marletta, A., Borissevitch, A. S., Dinelli, Batista, AA., Zílio, SC., Gonçalves, PJ, & Barbosa Neto., NM. (2012). Investigation of Ground- and Excited-State Photophysical Properties of 5,10,15,20-Tetra (4-pyridyl)- 21H, 23H-porphyrin with Ruthenium Outlying Complexes. *The Journal of Physical Chemistry*, 116, 18-26. https://doi.org/10.1021/jp205963k
59. Santos, F. A., Silva, R. M., Campos, A. R., de Araújo, R. P., Lima Júnior, R. C. P. & Rao, V. S. N., (2004). 1, 8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food and Chemical Toxicology*, 42 (4), 579-584. https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.001
60. Santos, R. D., Shetty, K., Cecchini, A. L. & Miglioranza, L. H. S., 2012. Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. Semina: Ciências Agrárias, 33(2), 655-666.
61. Selmi, S., Rtibi, k., Grami, D., Sebai, H. & Marzouki, L., 2017. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil components exhibitanti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects inexperimental diabetes. *Pathophysiology*, 915: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.08.002
62. Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. M. & Wall, D, S., (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99, 478–83. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.009
63. Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. & Corke, H., (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759. https://doi.org/10.1021/jf051513y
64. Soltani, M., Ghodratnama, M., Ebrahimzadeh-Mosavi, H. A., Nikbakht-Brujeni, G., Mohamadian, S. & Ghasemian, M., (2014). Shirazi thyme (*Zataria multiflora Boiss*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils repress expression of sagA, a streptolysin S-related gene in Streptococcus iniae. *Aquaculture*, 430, 248-252. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.012

65. Wang, S., Meckling, K. A., Marcone, M. F., Kakuda, Y. & Tsao, R., (2011). Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents. *Food Research Internationa*, 44(9), 2545- 2554. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.021
66. Wojdyło, A., Oszmianskii, J. & Czemerys, R., (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038
67. Yesil-Celiktas, O., Bedir, E. & Vardar Sukan, F., (2007). In vitro antioxidant activities of Rosmarinus officinalis extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 101, 1457-1464. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.055
68. Yesil-Celiktas, O., Girgin, G., Orhan, H., Wichers, H. J., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F., (2007b). Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *European Food Research and Technology*, 224,443-51. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.021
69. Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F., (2010b). Inhibitory effects of rosemary cxtracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human Cancer Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 158-163. https://doi.org/10.1007/s11130-010-0166-4
70. Young, IS. & Woodside, J., (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176- 186.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 483- 497

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۹۷-۴۸۳

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

Full Research Paper

Effect of oligofructose and microencapsulation on viability of *Lactobacillus rhamnosus* and physicochemical and sensory properties of functional jelly

Fatemeh Karegar[1], Rezvan Pourahmad[2*], Peyman Rajaei[3]

Received: 2021.03.19
Revised: 2021.06.02
Accepted: 2021.06.09
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Karegar, F., Pourahmad, R., Rajaei, P. (2022). Effect of oligofructose and microencapsulation on viability of *Lactobacillus rhamnosus* and physicochemical and sensory properties of functional jelly. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 483-497.

Abstract

Introduction: Nowadays, with the development of probiotic products on the world market, the need for developing new products containing probiotic bacteria becomes more apparent. Probiotics are defined as living microorganisms that, if consumed in sufficient quantities, will have beneficial effects on the health of the host. Probiotics are now widely used in the production of food products and account for approximately 65% of functional foods. Probiotics often belong to either the genus *Lactobacillus* or *Bifidobacterium*. *Lactobacillus rhamnosus* is one of the known probiotic bacteria with beneficial properties. Prebiotics are defined as indigestible compounds, mainly carbohydrates that can be used as carbon source for probiotic bacteria and stimulate their growth and viability. Oligofructose is a type of short chain inulin and is one of the most well- known prebiotics. Moreover, microencapsulation of probiotic bacteria can improve the survival of these bacteria. In this approach, living probiotic cells are covered or trapped by various compounds. Hydrocolloids such as alginate and carbohydrates such as starch can be suitable compounds for microencapsulation. The purpose of this study was to investigate the effect of oligofructose and microencapsulation on the viability of *Lactobacillus rhamnosus*, textural, physicochemical and sensory characteristics of functional jelly.

Materials and methods: In this study, different concentrations (0, 1.5 and 3 percent) of oligofructose as prebiotic were used to produce jelly samples, and 10^7 CFU/mL of probiotic bacteria (free and microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus*) was inoculated. Microencapsulation of probiotic bacteria was performed by emulsion method using sodium alginate and corn resistant starch. The jelly samples were stored at 4˚C for two weeks. pH, acidity, dry matter, firmness, probiotic bacterial count and sensory properties (taste, odor, texture, color and overall acceptance) of the samples were evaluated on the first, 7th and 14th days of jelly production. Seven samples including 6 treatments and 1 control sample (without probiotic bacteria and prebiotic compound) with three replications were studied. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test to determine the significant difference between samples at 95% confidence level ($p<0.05$) using the SAS 9.4 M4 Software. The charts were drawn by Excel 2013.

1. M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
(*Corresponding Author Email: rjpourahmad@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69465.1025

Results and discussion: The results of sensory evaluation showed that the effect of different percentages of oligofructose on the sensory parameters, except for the taste, was not significant ($p>0.05$). Using 1.5% oligofructose and probiotic bacteria (free or microencapsulated) did not change the score of taste but the use of 3% oligofructose and free probiotic bacteria decreased the score of this parameter. The effect of storage time on sensory properties (taste, odor, texture, color and overall acceptance) was significant ($p<0.05$) so that with increasing storage time, the score of sensory parameters decreased. The results of physicochemical tests indicated that with increasing oligofructose, dry matter increased and acidity decreased ($p<0.05$). The results of texture analysis showed that the microencapsulation of probiotic bacteria and addition of oligofructose significantly ($p<0.05$) increased the firmness of jelly texture. During storage period, pH and dry matter significantly ($p<0.05$) decreased but acidity and firmness of jelly texture increased. The results of probiotic bacterial count indicated that the use of microencapsulated probiotic bacteria and oligofructose significantly ($p<0.05$) increased the survival of *Lactobacillus rhamnosus*. The viability of probiotic bacterai decreased during storage period, t however, the number of probiotic bacteria in the samples was in the range of 10^6- 10^7 CFU/g. On the first and 7th days, no mold and yeast contamination was observed in the samples and on the 14th day, the number of molds and yeasts was less than 10 CFU/g. The sample containing microencapsulated probiotic bacteria and 3% oligofructose (sample 4) was selected as the best sample in terms of probiotic bacterial count and textural, physicochemical and sensory quality. Therefore, it is possible to produce synbiotic jelly with the desired quality.

Keywords: Oligofructose, Microencapsulation, Functional Jelly, *Lactobacillus rhamnosus.*

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 483- 497

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۹۷-۴۸۳

مقاله علمی-پژوهشی

اثر الیگوفروکتوز و ریزپوشانی بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی ژله فراسودمند

فاطمه کارگر[۱]- رضوان پوراحمد[۲*]- پیمان رجایی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹

چکیده

امروزه با گسترش فرآورده‌های پروبیوتیک در بازارهای جهانی، لزوم مطالعه بیشتر در خصوص تولید فرآورده‌های جدید حاوی این باکتری‌ها بیشتر آشکار می‌شود. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای تعریف می‌شوند که در صورت مصرف به مقدار کافی، اثرات مفیدی بر سلامت میزبان خواهند گذاشت. در حال حاضر پروبیوتیک‌ها به‌صورت گسترده‌ای در تهیه محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و تقریباً ۶۵٪ از غذاهای فراسودمند را به‌خود اختصاص می‌دهند. هدف از این تحقیق بررسی اثر الیگوفروکتوز و ریزپوشانی بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی ژله فراسودمند بود. در این تحقیق ۷ تیمار (۶ تیمار تست و ۱ تیمار شاهد) با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده شد. اثر زمان نگهداری بر مزه، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی معنی‌دار بود ($p<0.05$) اما اثر درصدهای مختلف الیگوفروکتوز به‌جز شاخص مزه بر سایر شاخص‌ها معنی‌دار نبود ($p>0.05$). نتایج نشان داد با افزایش زمان نگهداری شاخص‌های pH، زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک، ماده خشک و شاخص‌های ارزیابی حسی (مزه، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی) کاهش و مقدار اسیدیته و سفتی بافت افزایش معنی‌داری یافت ($p<0.05$). همچنین با افزایش مقدار الیگوفروکتوز شاخص‌های pH و ماده خشک افزایش ولی اسیدیته کاهش یافت ($p<0.05$). علاوه بر این افزودن الیگوفروکتوز و ریزپوشانی باکتری باعث افزایش سفتی بافت و زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک شد. نمونه حاوی باکتری ریزپوشانی‌شده و ۳٪ الیگوفروکتوز به‌عنوان بهترین نمونه از نظر تعداد باکتری‌های پروبیوتیک (10^7 CFU/g) و ویژگی‌های حسی و فیزیکوشیمیایی طی دوره نگهداری انتخاب گردید. بنابراین امکان تولید ژله فراسودمند با کیفیت مطلوب وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: الیگوفروکتوز، ریزپوشانی، ژله فراسودمند، *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*

مقدمه

امروزه در سراسر جهان به علت افزایش آگاهی مردم تقاضا برای غذاهای فراسودمند به‌سرعت افزایش‌یافته است. غذاهای فراسودمند، محصولاتی هستند که دارای اثرات سلامت‌بخش برای فرد مصرف‌کننده باشند. از جمله غذاهای فراسودمند محصولات پروبیوتیکی است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان کافی مصرف شوند، اثر سودمندی بر سلامتی میزبان می‌گذارند. اگرچه حد مجاز مصرف یا مقدار مطلوب و مؤثر باکتری‌های پروبیوتیک به عوامل زیادی از جمله ویژگی سویه، شرایط فیزیولوژیکی بدن، نوع رژیم غذایی و سلامتی فرد بستگی دارد ولی معمول‌ترین محدوده تعریف‌شده حدود 10^6-10^7 cfu/ml باکتری پروبیوتیک زنده در هر گرم از غذا ذکرشده است. برخی از اثرات سلامت بخش پروبیوتیک‌ها عبارت‌اند از مهار پاتوژن‌های باکتریایی، کاهش کلسترول، کاهش بیماری‌ها نظیر یبوست، اسهال، سرطان روده، تقویت تحمل لاکتوز، جذب کلسیم، تولید ویتامین‌ها و تحریک سیستم ایمنی. باکتری‌های پروبیوتیک عمدتاً شامل گونه‌های *لاکتوباسیلوس* هستند: *لاکتوباسیلوس‌ها*، باکتری‌های باسیلی شکل و کوکوباسیلی، گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز، اکسیداز و ایندول منفی هستند که قادر به احیاء نیترات نمی‌باشند. *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*[۴] یکی از شناخته‌شده‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک است. نقش آن در درمان اختلالات دستگاه گوارش کاملاً ثابت‌شده است.

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
* - نویسنده مسئول Email: rjpourahmad@yahoo.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69465.1025

4 *Lactobacillus rhamnosus*

پری‌بیوتیک‌ها ترکیباتی کربوهیدراته هستند که بدن قادر به هضم آن‌ها نیست ولی موجب بهبود ماندگاری پروبیوتیک‌ها در روده می شوند. پری‌بیوتیک‌ها اجزای غذایی غیرقابل هضم یا با هضم کم هستند که در برابر هضم در قسمت‌های بالایی دستگاه گوارش مقاوم هستند و بدون تغییر زیاد به روده می‌رسند و در کولون به صورت انتخابی توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک متابولیزه می‌شوند. معمولاً پری‌بیوتیک‌ها به‌عنوان ترکیبات با تخمیرپذیری انتخابی تعریف می‌شوند که باعث تغییرات ویژه در ترکیب و یا فعالیت بار میکربی روده و رفاه و سلامت میزبان می‌گردند. پری‌بیوتیک‌هایی که بیشتر مورد مطالعه و استفاده قرار گرفته‌اند شامل اینولین، فروکتوالیگوساکاریدها و گالاکتوالیگوساکاریدها هستند. ماده غذایی که به صورت هم‌زمان حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و ترکیبات پری‌بیوتیک باشد، سین‌بیوتیک نامیده می‌شود که در محصولات سین‌بیوتیک، پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها به‌منظور دستیابی به اثر هم‌افزایی مورداستفاده قرار می‌گیرند. غذاهای سین‌بیوتیک، بخش قابل توجهی از غذاهای فراسودمند را تشکیل می‌دهند (Golestani and Pourahmad, 2017).

اینولین مانند الیگوفروکتوز در دسته بتافروکتان‌ها می‌باشد. اینولین یک ترکیب پری‌بیوتیک غیرقابل هضم است. منبع اصلی اینولین مورد استفاده در صنعت غذا، سیب‌زمینی شیرین و ریشه کاسنی می‌باشد. اینولین ترکیبی محلول در آب بوده و حلالیت آن وابسته به دما است (Boroughni et al., 2018). در خصوص اثر پری‌بیوتیکی الیگوفروکتوز بر باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات غذایی، تحقیقاتی صورت گرفته است که از جمله می‌توان به بررسی‌های انجام شده توسط Butrabi و Marhamatizadeh (۲۰۱۸)، Boroughni و همکاران (۲۰۱۸)، Cardarelli و همکاران (۲۰۰۸)، Aghajani و همکاران (۲۰۱۴)، و Momtaheni و همکاران (۲۰۱۵) اشاره کرد.

علاوه بر افزودن ترکیبات پری‌بیوتیکی، روش مناسب دیگری که باعث بهبود بقاء و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک می‌گردد، ریزپوشانی این باکتری‌ها است. ترکیبات مورد استفاده برای پوشش دهی و محصور کردن پروبیوتیک‌ها باید در حلال‌های قابل قبول از نظرصنایع غذایی (آب، الکل) قابلیت انحلال داشته، همچنین از ترکیباتی با درجه غذایی بوده و مقرون به صرفه باشند. کربوهیدرات‌ها (نشاسته و مالتودکسترین)، هیدروکلوئیدها (نظیر کارگینان و آلژینات)، لیپیدها و پروتئین‌ها می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (Zuidam and Shimoni, 2010).

ژله یا لرزانک، آب‌میوه پخته‌شده در شکر حاوی ژلاتین است که در هوای سرد منعقد می‌شود. در حال حاضر ژله بیشتر به صورت پودر ژله یافت می‌شود که باید آن را با آب سرد و گرم مخلوط و در یخچال منعقد کرد (Azari Anpar et al., 2016). در خصوص تحقیقات مشابهی که انجام شده می‌توان به بررسی Sabzichi Esfahalan (۲۰۱۴) اشاره نمود که تولید ژله میوه‌ای سین‌بیوتیک با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و فروکتوالیگوساکارید را در دو سطح ۲ و ۴ درصد ارزیابی نمود و گزارش کرد که افزودن فروکتوالیگوساکارید باعث افزایش اسیدیته و کاهش pH نمونه‌ها طی دوره نگهداری می‌گردد و اثر مثبتی بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی دوره نگهداری دارد. همچنین Rajabpour و همکاران (۲۰۲۰) تولید ژله سین‌بیوتیک حاوی *باسیلوس کوآگولانس* و گالاکتوالیگوساکارید را بررسی نموده و اظهار داشتند امکان تولید محصول با ویژگی‌های کیفی مناسب وجود دارد و *باسیلوس کوآگولانس* از زنده‌مانی خوبی طی دوره نگهداری برخوردار است (Rajabpour et al., 2020). در یک پژوهش دیگر نیز Talebzadeh و Sharifan (۲۰۱۶) تولید دسر ژله پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را طی ۴۸ روز نگهداری بررسی نموده و گزارش کردند که زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نمونه‌های حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به نمونه‌های حاوی باکتری‌های آزاد طی دوره نگهداری به‌طور قابل توجهی بیشتر است (Talebzadeh and Sharifian, 2016). همچنین Miranda و همکاران (۲۰۲۰) تولید آب‌نبات ژله‌ای پروبیوتیک غنی شده با میوه‌های جنگل آتلانتیک و *باسیلوس کوآگولانس* را بررسی نموده و اعلام کردند این محصول طی ۹۰ روز نگهداری کیفیت فیزیکوشیمیایی و حسی مطلوبی داشته و جمعیت باکتری پروبیوتیک در آن بیش از 10^6 CFU/g بوده است (Miranda et al., 2020). تاکنون در خصوص تولید ژله فراسودمند حاوی *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* ریزپوشانی شده و الیگوفروکتوز بررسی انجام نشده است لذا هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر الیگوفروکتوز و ریزپوشانی بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* و خواص بافتی، فیزیکوشیمیایی و حسی ژله فراسودمند بوده است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*

لاکتوباسیلوس رامنوزوس PTCC 1637 به‌صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت فعال‌سازی باکتری، ویال حاوی باکتری به محیط MRS Broth منتقل گردید. سپس به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی منتقل و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس سوسپانسیون باکتری سانتریفوژ

شده و رسوب حاصله در آب پپتونه ۰/۱ درصد حل گردید. تراکم باکتری (۱/۵× ۱۰^۸ CFU/mL) با استفاده از روش مک فارلند به وسیله اسپکتروفتومتر تعیین شد (در واقع میزان جذب نور در سوسپانسیون باکتری درطول موج ۶۲۵ نانومتر باید ۰/۱۳– ۰/۰۸ باشد). در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون باکتری به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد تا تراکم ۱۰^۷ CFU/ml به دست آید (Mousavi et al., 2011).

ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*

ریزپوشانی باکتری با استفاده از روش امولسیون و در شرایط سترون انجام شد. ابتدا ۳ گرم آلژینات سدیم و ۲ گرم نشاسته مقاوم ذرت (Hi- maize 260 National starch UK) به آرامی به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. پس از حل شدن مواد در آب، محلول در اتوکلاو استریل و با محیط هم دما شد، محلول آلژینات با سوسپانسیون باکتری با غلظت تعیین شده (۱۰^۷ CFU/ml) به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردید تا همگن شود. برای تشکیل امولسیون، مخلوط حاصل با ۵۰۰ میلی‌لیتر روغن ذرت حاوی ۰/۲ درصد امولسیفایر توئین ۸۰ ریخته شد. با استفاده از همزن مغناطیسی (سرعت ۵۰۰rpm) به مدت ۳۰ دقیقه امولسیون یکنواختی تشکیل شد. به‌منظور تشکیل پوشینه‌ها به محلول مورد نظر، کلرید کلسیم ۰/۱ مولار اضافه و پس از ۳۰ دقیقه که پوشینه‌ها ته‌نشین شدند، به‌منظور جداسازی پوشینه‌ها از سانتریفوژ ۳۵۰G به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پوشینه‌های جداشده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Talebzadeh and Sharifan, 2017).

تهیه نمونه‌های ژله

تولید ژله با اقتباس از روش Hosseini Nejad و همکاران (۲۰۱۵) صورت گرفت. مقدار ۴۰ گرم پودر ژله با بلوم ۱۸۰ (کیوکب، چین) به یک لیتر آب مقطر اضافه گردید. الیگوفروکتوز (با درصدهای صفر، ۱/۵ و ۳ درصد) (کیوکب، چین) به آن افزوده و در حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً حل گردید. سپس برای مدت ۵ دقیقه جوشیده و تا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد سرد شد. باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* در غلظت ۱۰^۷ cfu/ml (به صورت آزاد و ریزپوشانی شده) به ژله در حال سرد شدن در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه‌شده و آهسته یکنواخت گردید. ژله نیم ساعت در دمای محیط قرارگرفته و بعد در یخچال به مدت دو هفته نگهداری شد. آزمون‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبی و ارزیابی حسی در روزهای اول، هفتم و چهاردهم انجام پذیرفت (Hosseini Nejad et al., 2015).

اسیدیته و pH

اسیدیته بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۲ اندازه‌گیری شد و نتایج برحسب درصد اسیدسیتریک گزارش شد (Anonymous, 2016). pH نمونه‌ها توسط pHمتر (Metrohm، سوئیس) اندازه‌گیری شد.

ماده خشک

مقدار ماده خشک با استفاده از قرار دادن نمونه در آون ۱۰۰ درجه و اندازه‌گیری وزن نمونه‌ها و استفاده از رابطه ۱ اندازه‌گیری شد (Anonymous, 2016):

$$TS = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \times 100 \quad (۱)$$

TS: ماده خشک (درصد).

M_3: وزن ظرف و نمونه بعد از خشک‌کردن برحسب گرم.

M_2: وزن ظرف و نمونه قبل از خشک‌کردن برحسب گرم.

M_1: وزن ظرف خالی.

سفتی بافت

سفتی بافت نمونه‌ها با استفاده از دستگاه آنالیز بافت مدل TA.Xtexpress با پروب استوانه‌ای ۲۲ میلی‌متر، عمق نفوذ ۴ میلی‌متر و سرعت ۲ میلی‌متر بر ثانیه اندازه‌گیری و ثبت شد (Rezaeizadeh and Raftani Amiri, 2017).

زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک

شمارش *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* با استفاده از محیط MRS آگار به‌وسیله روش پورپلیت انجام شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز صورت گرفت (Golestani and Pourahmad, 2017).

شمارش کپک و مخمر (کنترل آلودگی)

شمارش کپک و مخمر بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۸۹۹ با استفاده از محیط کشت سابرودکستروز آگار انجام پذیرفت. گرمخانه‌گذاری به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (Anonymous, 2008).

ارزیابی حسی

ارزیابی خصوصیات حسی (مزه، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی) با استفاده از روش هدونیک نه نقطه‌ای در فواصل زمانی روز اول، روز

هفتم و چهاردهم توسط ۱۰ ارزیاب آموزش‌دیده انجام پذیرفت که به نمونه خیلی خوب امتیاز: ۹ و نمونه خیلی ضعیف: ۱ تعلق گرفت (Hosseini Nejad et al., 2015).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور بررسی ویژگی‌های کمی و معنی‌داری داده‌ها با وجود ۷ تیمار و ۳ تکرار از آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ اطمینان استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های آماری از نرم‌افزار SAS 9.4 M4 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده شد.

نتایج و بحث

اسیدیته و pH

نتایج مقایسه میانگین pH نمونه‌ها (جدول ۱) نشان داد با افزایش درصدهای مختلف الیگوفرکتوز pH نمونه‌ها افزایش یافت ($p<0/05$). مطابق با نتایج پس از چهارده روز نگهداری بیشترین مقدار pH متعلق به تیمار T_4 بود و کمترین مقدار pH متعلق به تیمار T_6 بود. همچنین طی زمان نگهداری، pH نمونه‌ها به علت تولید اسیدهای آلی توسط باکتری پروبیوتیک کاهش یافت ($p<0/05$).

جدول ۱- مقدار pH ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری

Table 1- pH value of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

	Treatment تیمار	1 Day روز اول	7 Day روز هفتم	14 Day روز چهاردهم
T_1	Free bacteria+ 3% oligofructose باکتری آزاد+ ۳٪ الیگوفروکتوز	5.613 ± 0.055^{Acb}	5.653 ± 0.055^{Aa}	5.347 ± 0.006^{Bb}
T_2	Free bacteria+ 1.5% oligofructose باکتری آزاد+ ۱/۵٪ الیگوفروکتوز	5.543 ± 0.035^{Acd}	5.620 ± 0.104^{Aab}	5.363 ± 0.025^{Bb}
T_3	Free bacteria+ 0% oligofructose باکتری آزاد+ ۰٪ الیگوفروکتوز	5.463 ± 0.059^{Ad}	5.473 ± 0.078^{Ab}	5.393 ± 0.025^{Ab}
T_4	Microencapsulated bacteria +3% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده +۳٪ الیگوفروکتوز	5.683 ± 0.084^{Aab}	5.683 ± 0.112^{Aa}	5.540 ± 0.01^{Ba}
T_5	Microencapsulated bacteria + 1.5% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده+۱/۵٪ الیگوفروکتوز	5.257 ± 0.074^{Ae}	5.190 ± 0.036^{ABc}	5.133 ± 0.015^{Bc}
T_6	Microencapsulated bacteria + 0% oligofructose باکتری:ریزپوشانی‌شده+ ۰٪ الیگوفروکتوز	5.247 ± 0.078^{ABe}	5.143 ± 0.15^{Ac}	5.037 ± 0.021^{Bd}
T_7	Control شاهد	5.763 ± 0.11^{Aa}	5.763 ± 0.0745^{Aa}	5.523 ± 0.07^{Ba}

حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) بین تیمارها در هر زمان می‌باشد.

حروف بزرگ متفاوت در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) بین زمان‌های مختلف در هر تیمار می‌باشد.

مطابق با جدول ۲ با افزایش درصدهای مختلف الیگوفرکتوز مقدار اسیدیته کاهش یافت ($p<0/05$). در روز چهاردهم نگهداری بیشترین مقدار اسیدیته متعلق به تیمار T_6 بود و کمترین مقدار اسیدیته متعلق به تیمارهای T_3، T_4، T_1 و نمونه شاهد بود. طی زمان نگهداری، اسیدیته نمونه‌ها افزایش یافت ($p<0/05$). دلیل تغییرات اسیدیته و pH می‌تواند مربوط به زنجیره کوتاه الیگوفروکتوز و استفاده آسان‌تر آن برای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک باشد (Sabzichi Esfahalan, 2014). الیگوفروکتوز یک ترکیب پری‌بیوتیک رایج است که سبب تحریک رشد باکتری‌ها و تولید متابولیت‌ها توسط باکتری می‌شود، در نتیجه باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته نمونه‌ها طی دوره نگهداری می‌شود. به‌طور مشابه، Aminifar و همکاران (۲۰۱۶) خصوصیات فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی دسر لبنی فراسودمند حاوی مالت جو را بررسی کردند و اظهار داشتند pH نمونه‌های طی دوره نگهداری کاهش و اسیدیته نمونه‌ها افزایش یافت و دلیل آن را افزایش تولید اسیدلاکتیک توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک بیان کردند (Aminifar et al., 2016). همچنین Sabzichi Esfahalan (۲۰۱۴) تولید ژله میوه‌ای سین‌بیوتیک با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و فروکتوالیگوساکارید را بررسی و اعلام کرد که افزودن فروکتوالیگوساکارید باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته نمونه‌ها طی دوره نگهداری شد (Sabzichi

(Esfahalan et al., 2014). Cardarelli و همکاران (۲۰۰۸) کیفیت فیزیکوشیمیایی و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در نوعی پنیر حاوی اینولین و الیگوفروکتوز را بررسی و اعلام نمودند مقدار pH نمونه‌ها به دلیل فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک کاهش و اسیدیته آنها یافت (Cardarelli et al., 2008). باید متذکر شد که در تحقیق حاضر، مشخص گردید که ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک می تواند باعث افزایش pH شود به‌طوری‌که pH تیمار ۴ (حاوی باکتری ریزپوشانی شده و ۳٪ الیگوفروکتوز) بیشتر از تیمار ۱ (حاوی باکتری آزاد و ۳٪ الیگوفروکتوز) بوده و در کل pH تیمار ۴ از تمام تیمارها بیشتر است. در یک بررسی مشابه انجام شده توسط Talebzadeh و Sharifan (۲۰۱۶)، در روز اول تفاوت معنی‌داری بین pH نمونه‌های ژله حاوی باکتری پروبیوتیک آزاد و نمونه‌های حاوی باکتری ریزپوشانی شده، مشاهده نگردید ولی در پایان دوره نگهداری، pHنمونه حاوی باکتری ریزپوشانی شده بیشتر بود (Talebzadeh and Sharifian, 2016). در بررسی دیگری که توسط Mohammadi و همکاران (۲۰۱۴) انجام پذیرفت، تفاوت معنی‌داری بین pH نمونه‌های حاوی باکتری آزاد و نمونه‌های حاوی باکتری ریزپوشانی شده، مشاهده نگردید (Mohammadi et al., 2014).

جدول ۲- میزان اسیدیته (درصد بر حسب اسیدسیتریک) ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری

Table 2- Acidity value (citric acid %) of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

14 Day روز چهاردهم	7 Day روز هفتم	1 Day روز اول	Treatment تیمار	
0.820± 0.02^{dA}	0.703± 0.015^{dB}	0.610± 0.017^{dC}	Free bacteria+ 3% oligofructose باکتری آزاد+ ۳٪ الیگوفروکتوز	T_1
0.910± 0.01^{cA}	0.810± 0.026^{cB}	0.713± 0.015^{cC}	Free bacteria+ 1.5% oligofructose باکتری آزاد+ ۱/۵٪ الیگوفروکتوز	T_2
0.803± 0.015^{dB}	0.823± 0.021^{cB}	0.917± 0.015^{bA}	Free bacteria+ 0% oligofructose باکتری آزاد+ ۰٪ الیگوفروکتوز	T_3
0.803± 0.015^{dA}	0.700± 0.02^{dB}	0.603± 0.015^{dC}	Microencapsulated bacteria +3% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده +۳٪ الیگوفروکتوز	T_4
1.063± 0.064^{bA}	0.907± 0.021^{bB}	0.917± 0.021^{bB}	Microencapsulated bacteria + 1.5% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده+۱/۵٪ الیگوفروکتوز	T_5
1.133± 0.058^{aA}	1.127± 0.025^{aA}	1.130± 0.157^{aA}	Microencapsulated bacteria + 0% oligofructose باکتری:ریزپوشانی‌شده+ ۰٪ الیگوفروکتوز	T_6
0.813± 0.015^{dA}	0.717± 0.015^{dB}	0.623± 0.021^{cdC}	Control شاهد	T_7

حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین تیمارها در هر زمان می‌باشد.

حروف بزرگ متفاوت در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در هر تیمار می‌باشد.

ماده خشک

نتایج مقایسه میانگین ماده خشک نمونه‌ها (جدول ۳) نشان داد با افزایش مقدار الیگوفروکتوز مقدار ماده خشک نمونه‌ها افزایش یافت(p≤۰/۰۵). طی زمان نگهداری ماده خشک بیشتر نمونه‌ها کاهش یافت (p<۰/۰۵). پس از چهارده روز نگهداری بیشترین مقدار ماده خشک متعلق به تیمار T_4 بود و کمترین مقدار ماده خشک متعلق به نمونه شاهد بود. مواد جامد در مخلوط ژله، هرچه بیشتر جایگزین آب شود ارزش غذایی، قوام و بافت محصول را بهتر می‌کند. این خصوصیات به‌خصوص در مواقعی که افزایش مواد جامد در اثر افزودن کربوهیدرات باشد بیشتر خواهد شد و از آنجایی که فروکتوالیگوساکارید به‌عنوان جایگزین چربی با پایه کربوهیدرات می‌باشد قادر است تا ۳ برابر وزن خود آب جذب کند. دلیل کاهش ماده خشک طی دوره نگهداری می‌تواند به دلیل زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک و مصرف ترکیبات به خصوص کربوهیدرات توسط باکتری‌های پروبیوتیک برای رشد و فعالیت متابولیکی در طول فرایند تخمیر و حین نگهداری باشد (Rajabpour et al., 2020; Desouza et al., 2013; Rajabpour et al., 2020). Sabzichi Esfahalan (۲۰۱۴) در تولید ژله میوه‌ای سین‌بیوتیک نشان دادند نمونه حاوی ۴ درصد فروکتوالیگوساکارید دارای بیشترین مقدار ماده خشک بود (Sabzichi Esfahalan et al., 2014). Ahmadi و همکاران (۲۰۱۴) طی تحقیقی در به‌کارگیری باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به صورت ریزپوشانی و آزاد را در تهیه ماست بستنی

نشان دادند بیشترین میزان ماده خشک و افزایش حجم مربوط به نمونه‌های حاوی ۸ درصد فروکتوالیگوساکارید بود (Ahmadi et al., 2014).

جدول ۳- میزان ماده خشک (درصد) ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری

Table 3- Dried matter of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

14 Day روز چهاردهم	7 Day روز هفتم	1 Day روز اول	Treatment تیمار	
4.400± 0.065^{Ab}	4.567 ± 0.053^{Aa}	4.600 ±0.056^{aA}	Free bacteria+ 3% oligofructose باکتری آزاد+ ۳٪ الیگوفروکتوز	T_1
4.367± 0.058^{Bc}	4.467 ±0.028^{Aab}	4.533± 0.058^{abA}	Free bacteria+ 1.5% oligofructose باکتری آزاد+ ۱/۵٪ الیگوفروکتوز	T_2
4.033± 0.058^{Be}	4.200 ±0.020^{Ad}	4.300± 0.038^{cA}	Free bacteria+ 0% oligofructose باکتری آزاد+ ۰٪ الیگوفروکتوز	T_3
4.520± 0.053^{Aa}	4.570 ±0.053^{Aa}	4.592± 0.020^{aA}	Microencapsulated bacteria +3% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده +۳٪ الیگوفروکتوز	T_4
4.367± 0.058^{Ac}	4.500 ±0.073^{Aab}	4.528± 0.078^{abA}	Microencapsulated bacteria + 1.5% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده+۱/۵٪ الیگوفروکتوز	T_5
4.133± 0.044^{Bd}	4.238± 0.030^{Aab}	4.447± 0.051^{bA}	Microencapsulated bacteria + 0% oligofructose باکتری:ریزپوشانی‌شده+ ۰٪ الیگوفروکتوز	T_6
3.800± 0.073^{Bf}	4.300± 0.200^{Ac}	4.567± 0.085^{abA}	Control شاهد	T_7

حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین تیمارها در هر زمان می‌باشد.

حروف بزرگ متفاوت در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در هر تیمار می‌باشد.

جدول ٤- میزان سفتی بافت ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری

Table 4- Texture hardness of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

14 Day روز چهاردهم	7 Day روز هفتم	1 Day روز اول	Treatment تیمار	
179.333± 3.512^{aA}	172.333± 3.215^{cdB}	171.000± 3.000^{bbB}	Free bacteria+ 3% oligofructose باکتری آزاد+ ۳٪ الیگوفروکتوز	T_1
175.000± 1.732^{bA}	171.333± 1.041^{cdB}	169.000± 1.000^{bcC}	Free bacteria+ 1.5% oligofructose باکتری آزاد+ ۱/۵٪ الیگوفروکتوز	T_2
173.333± 2.309^{cA}	170.000± 1.359^{dB}	163.333± 2.887^{dC}	Free bacteria+ 0% oligofructose باکتری آزاد+ ۰٪ الیگوفروکتوز	T_3
181.000± 1.557^{aA}	180.000± 1.000^{aA}	175.333± 2.509^{aB}	Microencapsulated bacteria +3% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده +۳٪ الیگوفروکتوز	T_4
180.000± 1.583^{aA}	1791.000± 3.000^{abA}	173.333± 3.504^{abB}	Microencapsulated bacteria + 1.5% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده+۱/۵٪ الیگوفروکتوز	T_5
175.333± 2.082^{bA}	173.667± 2.033^{cB}	168.333± 2.082^{bcC}	Microencapsulated bacteria + 0% oligofructose باکتری:ریزپوشانی‌شده+ ۰٪ الیگوفروکتوز	T_6
169.667± 3.041^{dA}	168.000± 1.000^{eA}	158.333± 1.505^{cB}	Control شاهد	T_7

حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین تیمارها در هر زمان می‌باشد.

حروف بزرگ متفاوت در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در هر تیمار می‌باشد.

سفتی بافت

مقایسه میانگین سفتی بافت نمونه‌ها نشان داد با افزایش مقدار الیگوفروکتوز و ریزپوشانی باکتری و همچنین با افزایش زمان نگهداری مقدار سفتی بافت افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). در تمام زمان‌های نگهداری مقدار سفتی نمونه‌ها از نمونه شاهد بیشتر بود. پس از چهارده روز نگهداری بیشترین سفتی بافت متعلق به تیمارهای T_1، T_4 و T_5 و کمترین سفتی بافت متعلق به نمونه شاهد بود. یکی از عوامل تأثیرگذار بر کیفیت بافت مواد غذایی، ترکیبات و اجزای فرمولاسیون آن‌ها می‌باشد. برای برخی مواد غذایی بافت از رنگ و طعم آن مهم‌تر است. خواص بافتی مواد غذایی در پذیرش آن از سوی مصرف‌کننده اهمیت و نقش به سزایی دارد. سفتی یا قدرت ژل به غلظت ژلاتین، سفتی ذاتی ژلاتین، pH، دما و حضور افزودنی‌ها بستگی دارد. سفتی ذاتی ژلاتین یک عملکرد از ساختمان و وزن مولکولی آن است (Burey et al., 2009). علت افزایش سفتی بافت با افزایش پری‌بیوتیک الیگوفروکتوز تا سطح ۳ درصد می‌تواند به زنجیره آن مرتبط باشد. این ترکیب قادر به جذب مولکول‌های آب و تشکیل شبکه ژل مانند بوده که می‌تواند باعث تقویت سفتی نمونه‌ها شود (Sabzichi Esfahalan, 2014). Ricardo و همکاران (۲۰۱۱) طی تحقیقی پیرامون اثر اینولین به‌عنوان یک پری‌بیوتیک بر پایداری شیر تخمیر شده با گونه‌های مختلف باکتری پروبیوتیک نشان دادند اینولین باعث افزایش میزان سفتی و استحکام نمونه‌ها می‌شود (Ricardo et al., 2011).

زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک

مطابق با جدول ۵ در روز اول، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نگردید. در روزهای هفتم و چهاردهم تفاوت بین تیمارها معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بود و بیشترین شمارش باکتری پروبیوتیک در تیمار T_4 (حاوی باکتری ریزپوشانی شده و ۳٪ الیگوفروکتوز) مشاهده گردید و کمترین شمارش باکتری پروبیوتیک متعلق به تیمارهای T_2 و T_3 بود. همچنین با افزایش زمان نگهداری، شمارش باکتری پروبیوتیک در تمام تیمارها به‌جز T_4 کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) یافت. بین کاهش pH و کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک رابطه مستقیمی وجود دارد.

جدول ۵- شمارش لاکتوباسیلوس رامنوزوس (Log CFU/g) در ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری

Table 5- Count of *Lactobacillus rhamnosus* (Log CFU/g) in functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

	Treatment تیمار	1 Day روز اول	7 Day روز هفتم	14 Day روز چهاردهم
T_1	Free bacteria+ 3% oligofructose باکتری آزاد+ ۳٪ الیگوفروکتوز	7.032 ± 0.024^{Aa}	6.892 ± 0.015^{Bc}	6.761 ± 0.012^{Cd}
T_2	Free bacteria+ 1.5% oligofructose باکتری آزاد+ ۱/۵٪ الیگوفروکتوز	6.999 ± 0.007^{Aa}	6.845 ± 0.006^{Bd}	6.719 ± 0.017^{Ce}
T_3	Free bacteria+ 0% oligofructose باکتری آزاد+ ۰٪ الیگوفروکتوز	7.005 ± 0.014^{Aa}	6.799 ± 0.007^{Be}	6.736 ± 0.007^{Ce}
T_4	Microencapsulated bacteria +3% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده +۳٪ الیگوفروکتوز	7.03 ± 0.011^{Aa}	7.083 ± 0.006^{Aa}	7.035 ± 0.012^{Aa}
T_5	Microencapsulated bacteria + 1.5% oligofructose باکتری ریزپوشانی‌شده+۱/۵٪ الیگوفروکتوز	6.997 ± 0.007^{ABa}	7.001 ± 0.007^{Ab}	6.99 ± 0.003^{Bb}
T_6	Microencapsulated bacteria + 0% oligofructose باکتری:ریزپوشانی‌شده+ ۰٪ الیگوفروکتوز	7.041 ± 0.028^{Aa}	$6.979\pm 0.025^{B}b$	6.943 ± 0.003^{Bc}
T_7	Control شاهد	-	-	-

حروف کوچک متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین تیمارها در هر زمان می‌باشد.

حروف بزرگ متفاوت در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین زمان‌های مختلف در هر تیمار می‌باشد.

به عبارت دیگر کاهش بیش از حد pH طی دوره نگهداری می‌تواند به دلیل مصرف کربوهیدرات‌ها و تولید اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها باشد. پدیده کاهش pH می‌تواند به دلیل رها شدن آنزیم‌هایی از سلول‌های باکتری مرده طی دوره نگهداری تشدید یابد. همچنین مشخص شده که باکتری‌های ریزپوشانی شده در برابر محیط با pH کمتر و دمای بیشتر مقاوم‌تر بوده و نسبت به

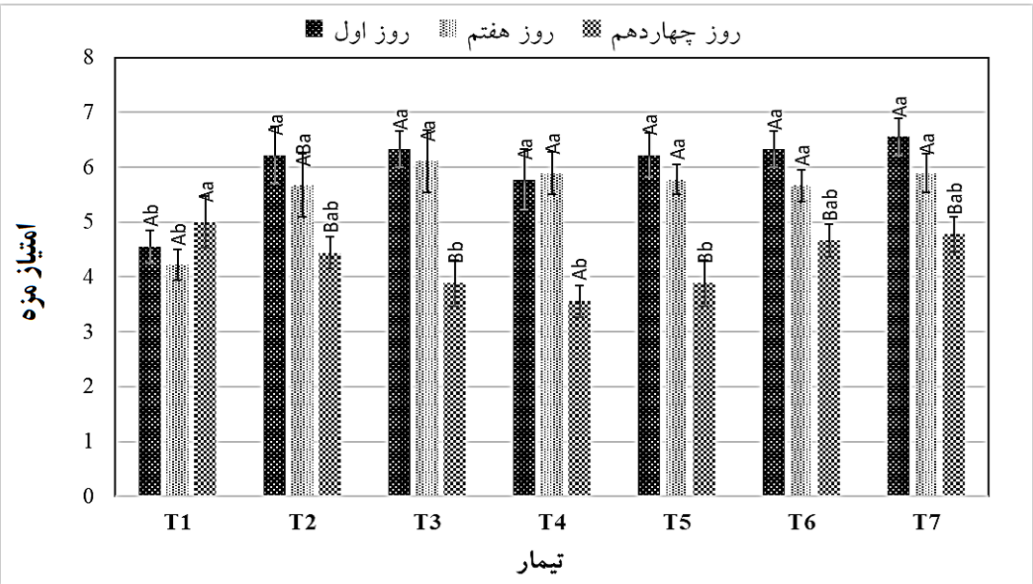
باکتری‌های آزاد زنده‌مانی بیشتری دارند (Talebzadeh and Sharifian, 2016). تکنیک ریزپوشانی به‌عنوان یکی از روش‌های مؤثر برای نگهداری و افزایش قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها اثبات شده است زیرا میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را در طی زمان فرآیند و نگهداری و در شرایط اسیدی داخل معده محافظت می‌کند (Martin et al., 2014). به‌طور مشابه، Rajabpour و همکاران (۲۰۲۰) اعلام کردند تعداد باکتری پروبیوتیک در ژله سین‌بیوتیک حاوی *باسیلوس کوآگولانس* و گالاکتوالگوساکارید طی زمان نگهداری کاهش یافت (Rajabpour et al., 2020). Boroughni و همکاران (۲۰۱۸) در یک پژوهش مشابه دیگر، پیرامون اثر الیگوفروکتوز و نوع کشت میکروبی بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در ماست پروبیوتیک اظهارداشتند، مقدار pH و تعداد باکتری‌های پروبیوتیک با گذشت زمان کاهش و مقدار اسیدیته افزایش یافت (Boroughni et al., 2018). همچنین Pyrani (۲۰۱۳) طی بررسی فرمولاسیون تولید دسر لبنی سین‌بیوتیک بر پایه غلات حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با استفاده از تکنولوژی ریزپوشانی طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اعلام نمود که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک طی دوره نگهداری کاسته شد (Pyrani et al., 2013). Talebzadeh و Sharifian (۲۰۱۶) در یک تحقیق مشابه دیگر، دسر ژله پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را طی ۴۸ روز نگهداری بررسی کردند (Talebzadeh and Sharifian, 2016). نتایج نشان داد تیمارهای حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به تیمارهای حاوی باکتری‌های آزاد حتی در روزهای ۳۵ و ۴۸ نگهداری هم دارای جمعیت پروبیوتیک قابل قبول بودند. همچنین افزایش زمان نگهداری باعث کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک شد و در روزهای ۳۵ و ۴۸ نگهداری هیچ‌گونه باکتری پروبیوتیکی در حالت آزاد وجود نداشت. به‌طور مشابه، Mohammadi و همکاران (۲۰۱۱) طی بررسی بستنی پروبیوتیک نشان دادند پلی‌ساکاریدهای کوتاه زنجیر که ترکیبات پری‌بیوتیک نامیده می‌شوند مفیدترین اثر را بر پایداری پروبیوتیک‌ها دارند و می‌توانند بر بافت محصول اثر مفیدی داشته باشند (Mohammadi et al., 2011). Akin و همکاران (۲۰۰۷) نیز اثر اینولین و شکر بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در بستنی پروبیوتیک را بررسی کردند و اظهار داشتند؛ با گذشت زمان از تعداد باکتری‌های پروبیوتیک کاسته می‌شود (Akin et al., 2007).

کپک و مخمر

شمارش کپک و مخمر صرفا به‌منظور کنترل آلودگی ثانویه انجام پذیرفت. در روزهای اول و هفتم نگهداری، آلودگی کپک و مخمر در نمونه‌ها مشاهده نشد و در روز چهاردهم تعداد کپک و مخمر در نمونه‌ها کمتر از ۱۰ CFU/g بود.

ارزیابی حسی

نتایج ارزیابی حسی نمونه‌های ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری در شکل‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ نشان داده است. با توجه به شکل ۱، پس از چهارده روز نگهداری بیشترین امتیاز مزه متعلق به تیمارهای T_2، T_4، T_6 و نمونه شاهد بود و بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری از نظر مزه وجود نداشت همچنین طی زمان نگهداری امتیاز مزه نمونه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). با توجه به شکل ۲، در تمامی دوره‌های نگهداری اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها از نظر امتیاز بو مشاهده نگردید و باگذشت زمان نگهداری امتیاز بو نمونه‌ها کاهش معنی‌داری یافت ($p <۰/۰۵$). با توجه به شکل ۳، در تمامی دوره‌های نگهداری نمونه‌ها از نظر امتیاز بافت تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند و امتیاز بافت نمونه‌ها طی زمان نگهداری کاهش معنی‌داری یافت ($p <۰/۰۵$). مطابق با نتایج ارائه شده در شکل ۴، در کلیه روزهای نگهداری هیچ تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها از نظر رنگ وجود نداشت. همچنین طی زمان نگهداری امتیاز رنگ نمونه‌ها کاهش معنی‌داری یافت ($p <۰/۰۵$). مطابق با نتایج ارائه شده در شکل ۵، در کلیه روزهای نگهداری هیچ تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها از نظر پذیرش کلی وجود نداشت و طی زمان نگهداری امتیاز پذیرش کلی نمونه‌ها کاهش معنی‌داری یافت ($p<۰/۰۵$). به‌طور کلی نتایج ارزیابی حسی نشان داد با افزایش زمان نگهداری امتیازات بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی همسو با نمونه شاهد کاهش یافت. افزودن ۱/۵ درصد الیگوفروکتوز و تلقیح باکتری پروبیوتیک (به صورت آزاد و ریزپوشانی شده) تغییری در امتیاز مزه ایجاد نگردید ولی با افزودن ۳ درصد الیگوفروکتوز و تلقیح باکتری پروبیوتیک به صورت آزاد امتیاز مزه کاهش یافت. درک طعم در سیستم‌های ژلی به سفتی بافت و نوع عامل ژل‌کننده وابسته است. زمانی که بافت نمونه سفت می‌باشد زمان بیشتری لازم است تا نمونه خرد شود و به‌نظر می‌رسد به این دلیل درک مواد طعم‌زا کاهش می‌یابد و چون درک طعم و پذیرش نمونه رابطه مستقیمی دارد، سفتی بافت منجر به کاهش درک طعم و در نتیجه کاهش پذیرش نمونه می‌شود (Rezaee et al., 2012). همچنین برخی تحقیقات نشان داده‌اند رهاسازی طعم به‌طور معنی‌داری با بافت ژل در ارتباط است. ژل ژلاتین به دلیل ایجاد بافت سفت‌تر باعث رهایش کمتر مواد طعمی می‌شود و در مجموع این وقایع باعث کاهش امتیازات ارزیابی حسی به‌ویژه امتیاز پذیرش کلی می‌شود (Koliandris et al., 2008). Nabipour (۲۰۱۶) طی تحقیقی اعلام نمود، در نمونه‌های ژله با غلظت های پایین ژلاتین و کنسانتره انار با توجه به بافت و ظاهر نامناسب و عدم وجود رنگ مناسب، پذیرش کلی بسیار پایین است (Nabipour, 2016).

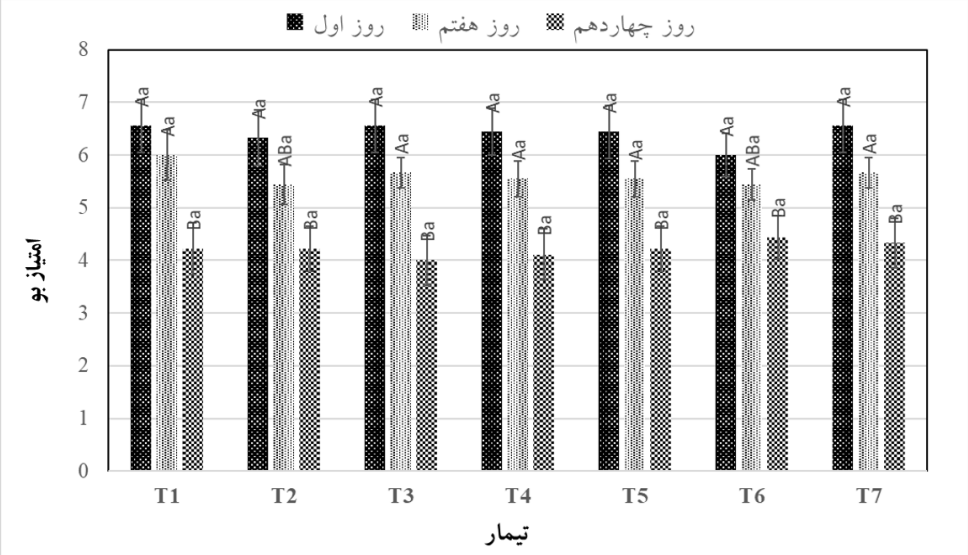


شکل ۱ - امتیاز مزه ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری

Fig. 1. Taste score of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در یک تیمار می‌باشد.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف در یک زمان می‌باشد.



شکل ۲- امتیاز بو ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری

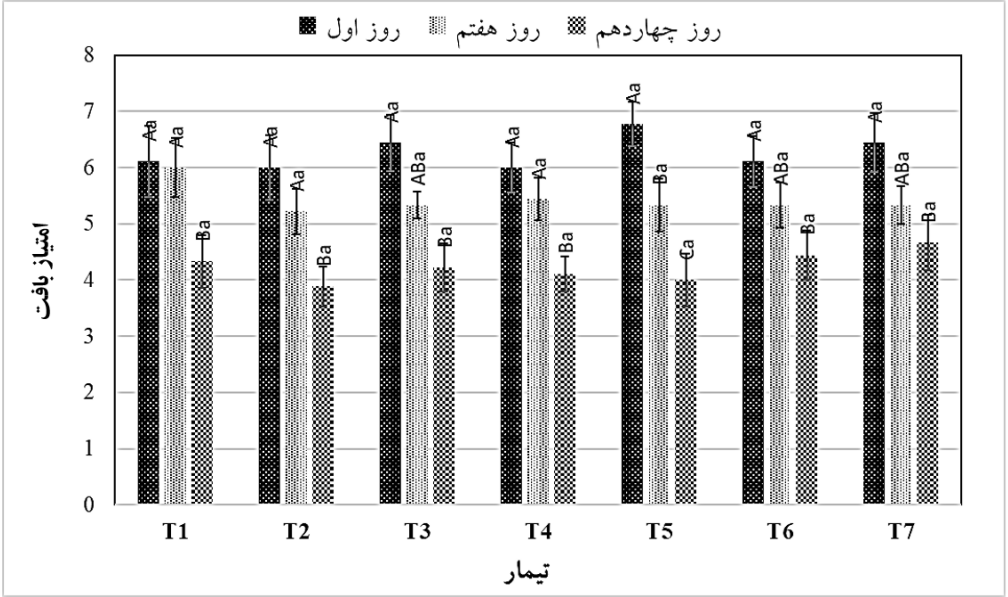
Fig. 2. Odor score of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در یک تیمار می‌باشد.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی دار (p< ۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف در یک زمان می‌باشد.

Moghadas Kiya و همکاران، (۲۰۱۸) اثر ژلاتین و میزان کنسانتره انار در فرمولاسیون ژله پروبیوتیک را مورد مطالعه قرار دادند (Moghadas Kiya et al., 2018). با افزایش درصد ژلاتین، تأثیر منفی بر پذیرش کلی مشاهده شد. در ارزیابی ماندگاری باکتری پروبیوتیک، بیشترین میزان رشد باکتری در روز هجدهم نگهداری به دست آمد. بر مبنای نتایج این پژوهش، می‌توان در فرمولاسیون ژله خوراکی با کاربرد سویه پروبیوتیک و جایگزینی کنسانتره انار، قابلیت پذیرش فرآورده نهایی و خواص سلامت بخشی آن را افزایش داد و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن را بهبود بخشید. Talebzadeh و Sharifian (۲۰۱۶) دسر ژله‌ای پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را طی نگهداری بررسی کردند. نتایج نشان داد نمونه‌های ژله حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به

باکتری‌های آزاد دارای پذیرش کلی بهتری بودند (Talebzadeh and Sharifian, 2016). در یک بررسی مشابه دیگر، Rajabpour و همکاران (۲۰۲۰) اعلام نمودند استفاده از باکتری پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* و ترکیب پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید اثر معنی‌داری بر ویژگی‌های حسی ژله سین‌بیوتیک نسبت به نمونه شاهد نداشت و در پایان دوره نگهداری، نمونه‌ها از کیفیت حسی قابل قبولی برخوردار بودند (Rajabpour et al., 2020).

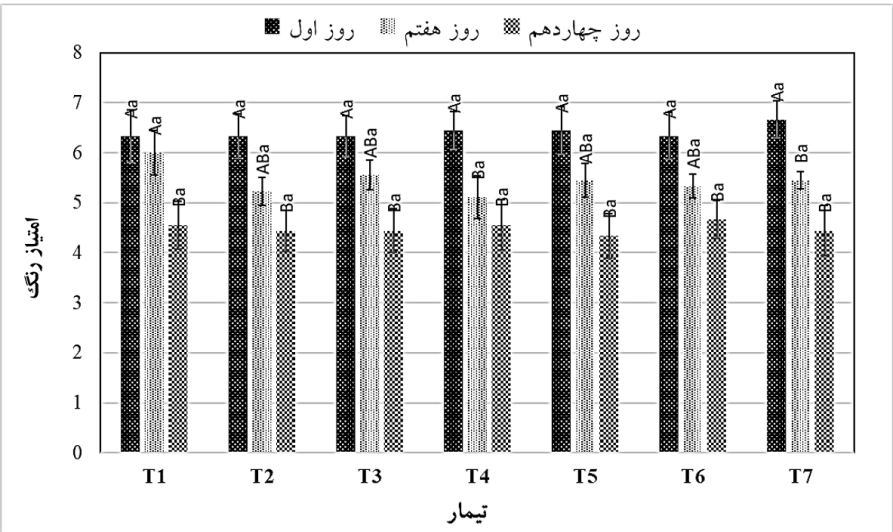


شکل ۳- امتیاز بافت ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ١٤ روز نگهداری

Fig. 3. Texture score of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در یک تیمار می‌باشد.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی دار (p< ۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف در یک زمان می‌باشد.

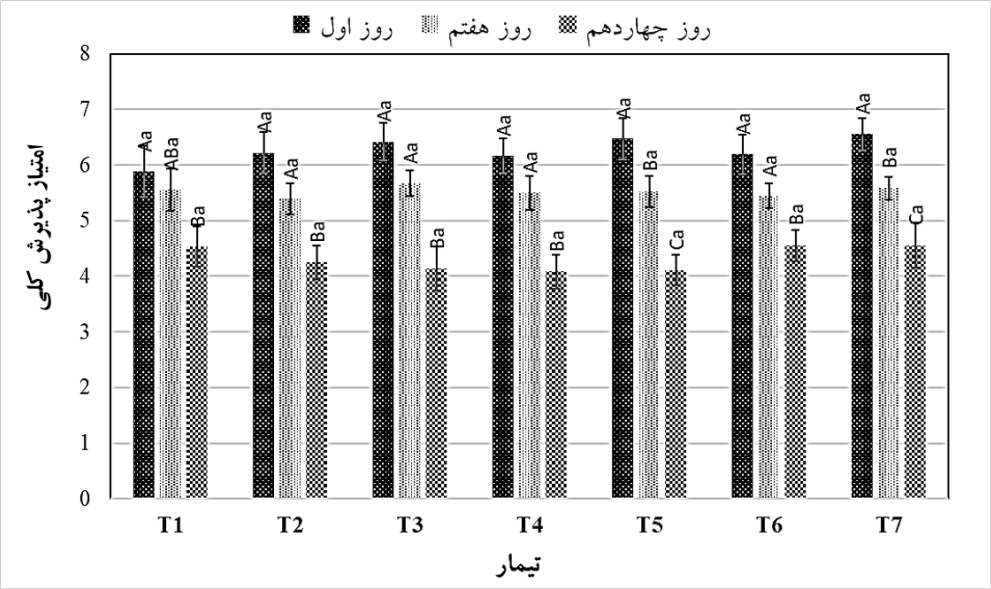


شکل ٤- امتیاز رنگ ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ١٤ روز نگهداری

Fig. 4. Color score of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در یک تیمار می‌باشد.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی دار (p< ۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف در یک زمان می‌باشد.



شکل ۵- امتیاز پذیرش کلی ژله فراسودمند حاوی الیگوفروکتوز طی ۱۴ روز نگهداری

Fig. 5. Overall acceptance score of functional jelly containing oligofructose during 14 days of storage

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) بین زمان‌های مختلف در یک تیمار می‌باشد.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی دار (p< ۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف در یک زمان می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این تحقیق به‌منظور بررسی اثر الیگوفروکتوز و ریزپوشانی بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* و ویژگی‌های بافتی، فیزیکوشیمیایی (pH، اسیدیته و ماده خشک) حسی (مزه، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی) ژله فراسودمند انجام گردید. نتایج حاکی از اثر مثبت ریزپوشانی و افزودن پری بیوتیکی الیگوفروکتوز بر ویژگی‌های کیفی ژله فراسودمند بود. در واقع با افزایش مقدار الیگوفروکتوز شاخص‌های pH و ماده خشک افزایش و مقدار اسیدیته کاهش یافت. علاوه بر این افزودن الیگوفروکتوز و ریزپوشانی باکتری باعث افزایش سفتی بافت و زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک شد. طی زمان نگهداری، شاخص‌های pH، زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک، ماده خشک و پارامترهای حسی (مزه، بو، بافت، رنگ و پذیرش‌کلی) کاهش و مقدار اسیدیته و سفتی بافت افزایش یافت. تیمار T4 (باکتری ریزپوشانی‌شده+ ۳٪ الیگوفروکتوز) دارای بالاترین جمعیت باکتری پروبیوتیک، کمترین اسیدیته، بالاترین pH بود و در ضمن بیشترین سفتی بافت را داشت. به همین دلیل این تیمار به‌عنوان تیمار برتر انتخاب گردید. بنابراین امکان تولید ژله سین بیوتیک با کیفیت مطلوب وجود دارد.

منابع

1. Aghajani, A., Pourahmad, R. and Mahdavi Adeli, H. R. (2014). The effect of oligofructose, lactulose and inulin mixture as prebiotic on physicochemical properties of synbiotic yogurt. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 4(2): 33-40.
2. Ahmadi, A., Milani, E., and Madadlou, A. (2014). Synbiotic yogurt-ice cream produced via incorporation of microencapsulated *lactobacillus acidophilus* (la-5) and fructooligosaccharide. *Journal Food Science and Technology*, 51: 1568–1574. https://doi.org/10.1007/s13197-012-0679-y
3. Akin, M. B., Akin, M. S. and Kirmaci, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chemistry*, 104: 93-99. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.030
4. Aminifar, M., Miyani, S., Alami, M., Ghaffarpour, M., Dastmalchi, F., Maghsoudloo, Y., and Mohammadi, M. (2016). Investigation of physicochemical, textural and sensory properties of ultra-beneficial dairy dessert with barley malt without shell. *Iranian Biosystems Engineering*, 47(3): 509-501 (in Persian).
5. Anonymous, (2008). Iranian Institute of Standards and Industrial Research. Measuring the amount of mold and yeast in desserts. National Standard No. 1-10899 (in Persian).

6. Anonymous, (2016). Iranian Institute of Standards and Industrial Research. Jelly products, characteristics and test methods, National Standard No. 2682 (in Persian).
7. Azari Anpar, M., Khamiri, M., Alami, M., and Faraji Kafshgari, S. (2016). Microencapsulation and increase the stability and efficiency of probiotics. The Second National Conference on Probiotics and Healthy Foods, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (in Persian).
8. Boroughni, M., Pourahmad, R., and Akbari Moghari, A. (2018). The effect of oligofructose and type of microbial culture on the amount of conjugated linolenic acid and the survival of probiotic bacteria in probiotic yogurt. *Journal of Food Microbiology*, 5(3): 48-36 (in Persian).
9. Burey, P., Bhander, B. R., Rutgers, R .P .G., Halley, P. J , and Torley, P. J. (2009). Confectionery gels: A review formulation,rheological and structural aspect. *International Journal of Food Properties*, 12(1): 176-210. https://doi.org/10.1080/10942910802223404
10. Butrabi, S. Z., and Merhamatizadeh, M. (2018). The effect of adding inulin and oligofructose in probiotic ice cream using *Bifidobacterium bifidum*, 12th Iranian Congress of Veterinary Students, Semnan, Semnan University (in Persian).
11. Cardarelli, H. R., Buriti, F. C. A., Castro, I. A., and Saad, S. M. I. (2008). Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. *LWT- Food Science and Technology*, 41(6): 1037–1046. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.07.001
12. Desouza, A. H. P, Costa G. A. N, da Silva Miglioranza, L. H, Furlaneto–Maia L and Oliveira A. F. (2013). Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. Acta Scientiarum. *Journal of Health Sciences*, 351:125–131.
13. Ebrahimi Jam, S., Zarringhalami, S., and Ganjloo, A. (2019). Quinoa– based gluten– free fermented beverage Production using probiotic bacteria. *Journal of Food Research*, 29(1): 27-42.
14. Golestani, M. and Pourahmad, R. (2017). Comparison of three treatments (two fermented treatments and one non-fermented treatment) in production of synbiotic ice cream. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (2): 1-6. https://doi.org/10.1111/jfpp.12839
15. Hosseini Nejad, M., Mohtashami, M., Kamali, S., and Elahi, M. (2015). Optimization of low-calorie fruit jelly powder formulations using sucralose and isomalt sweeteners. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Industry*, 4(1): 74-65 (in Persian).
16. Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., and Morales, M. E. (2014). Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects. Innov. *Food Science and Emerging Technology*, 27, 15–25. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010
17. Miranda, J. S., Costa, B. V., de Oliveira, I. V., de Lima, D. C. N., Martins, E. M. F., Júnior, B. R. D. C. L., ... & Martins, M. L. (2020). Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and Bacillus coagulans GBI-30 6086. *Lwt*, *126*, 109275.https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109275
18. Moghadas Kiya E, Nabi poor Barbin M, Ghasem pooor Z, Naseri L, and Ehsani A. (2018). A survey about qualitative and sensory indices of edible jelly containing pomegranate concentrate and *Lactobacillus paracasei*, *FSCT*, 15 (77): 88-79 (in Persian).
19. Mohammadi, N., Fahimdanesh, M., Ahari, H. and Khosravi Zanjani, M.A. (2014). Production of functional mayonnaise sauce using probiotic bacteria microencapsulated by alginate and resistant corn starch. *Food Technology and Nutrition*, 11 (2): 73-80 (in Persian).
20. Mohammadi, R., Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., and Cruz, A. G. (2011). Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Food Microbiology*, 61:411–424. https://doi.org/10.1007/s13213-010-0188-z
21. Momtaheni, S., Pourahmad, R. and Akbarian Mooghari, A. (2015). Physicochemical, microbial and sensory characteristics of low-fat stirred yogurt containing *Bifidobacterium lactis* and prebiotic compounds. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 12(3): 361-367.
22. Mousavi, Z. E., Mousavi, Z., Razavi, S. H.. Emam_Djomeh, Z., and Kiani. H. (2011). Fermontation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Microbiology & Biotechnol*ogy, 27:123-128. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0436-1
23. Nabipour Barbain, M. (2016). Evaluation of physicochemical and microbial properties of probiotic edible jelly containing pomegranate concentrate, Master Thesis, Department of Food Science and Technology, Afagh Institute of Higher Education, Urmia (in Persian).
24. Pyrani, S. (2014). Formulation of dairy synbiotic dessert based on cereals using microencapsulation technology of probiotic organism, Master Thesis, Faculty of Agriculture and Veterinary Sciences, Islamic Azad University of Sabzevar (in Persian).

25. Rajabpour, N., Mansouripour, S. And Hamedi, J. (2020). Feasibility study of producing and evaluation the quality properties of probiotic and synbiotic jelly containing *Bacillus coagulans. Journal of Food Microbiology*, 7 (2): 34-43 (in Persian).
26. Rezaee, F. Shahidi, M. Elahi, M. Mohebbi, M. and Nassiri Mahallati, (2012). Texture Profile Analysis of Plum Pastille by Sensory and Instrumental Methods and Optimization of its Formulation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 8(1), 30 (in Persian).
27. Rezaeizadeh, A. and Raftani Amiri, Z, (2017). Extraction and properties of chicken leg gelatin and its application in cantaloupe jelly. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 13 (2): 322-332 (in Persian).
28. Ricardo, P. D. S. O., Patrizia, P., Marice, N. D. O., and Attilio, C. (2011). Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engeeniring*, 107:36-40. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.005
29. Sabzichi Esfahalan, A. (2014). Production of synbiotic fruit jelly using Lactobacillus acidophilus and fructooligosaccharide, Master Thesis, Faculty of Agricultural Sciences, University of Tabriz (in Persian).
30. Talebzadeh, S., and Sharifan, A. (2016). Developing Probiotic Jelly Desserts with *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1): 1745-4549. https://doi.org/10.1111/jfpp.13026
31. Zuidam, N. and Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In N. J. Zuidam and V. Nedovic (Eds.), Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing (pp. 3-29): Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_2

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 498- 513

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۱۳-۴۹۸

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

Full Research Paper

Using pistachio peel powder and melon seed flour to enrich the Functional-low-fat mayonnaise sauce and evaluation its rheological properties

Faezeh Ghorch Beigi[1], Alireza Rahman[2*], Fatemeh Hosseinmardi[3]

Received: 2021.04.22
Revised: 2021.10.11
Accepted: 2021.10.18
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Ghorch Beigi, F., Rahman, A., Hosseinmardi, F. (2022). Using pistachio peel powder and melon seed flour to enrich the Functional-low-fat mayonnaise sauce and evaluation its rheological properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 498-513.

Abstract

Introduction: With the increasing the global population and the scarcity of food resources, using agricultural waste has become a recent challenge for food scientists.

Materials and methods: In this study, to optimize the amount of crop residues and the preparation and formulation of dietary and beneficial sauce, two crop residues, pistachio peel, and melon seed, were used as flour. In this study, treatments of mayonnaise sauce were formulated using pistachio peel powder with 0, 0.1, 0.5, 0.75, and melon seed flour with 6, 12, 18, 24, 30, and 36%. Mayonnaise treatments were evaluated at time intervals of the production day, 30th day, 60th day, 90th day for pH, moisture content, ash (%), fat (%), carbohydrate (%), protein (%), colorimetric indices (Lightness, redness, yellowness), viscosity, total microbial population, stability test, and particle size. For the sensory evaluation, the 5-point hedonic test was performed by ten trained panelists scoring these components (color, taste, texture, fluctuation, consistency, general acceptance). Statistical analysis was performed using Minitab 17 software at the statistical level of 0.05.

Results and discussions: The results showed that moisture content, carbohydrate, ash, protein, pH, viscosity, and particle size were increased by increasing pistachio peel powder and melon seed flour. Total microbial population and the stability of mayonnaise treatments were significantly decreased ($p \leq 0.05$). Also, by increasing storage time, moisture content and the stability of mayonnaise and particle size were increased. Rheological indices such as cohesion decreased, and firmness and adhesion indices were increased ($p \leq 0.05$). All sensory scores of mayonnaise treatments decreased during storage time, and finally, treatment coded T1(0.1% replacement of pistachio green peel powder and 6% melon seed flour) was selected as optimal, and T6 with 0.75% replacement of pistachio green peel powder and 36% melon seed flour) as worst sample. The use of pistachio peel powder and melon seed flour significantly reduced the microbial population of mayonnaise treatments. Higher values than the optimum treatment cannot be used due to decrease in the stability and increase in the microbial population, as well as reduction of sensory scores.

Keywords: Mayonnaise sauce, Pistachio peel powder, Melon seed flour.

1. M.Sc. student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Ghods Branch, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Ghods Branch, Tehran, Iran.
3. Instructor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Ghods Branch, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: alireza_rahman@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68966.1022

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 498- 513

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۱۳-۴۹۸

مقاله علمی-پژوهشی

استفاده از ضایعات پوست پسته و آرد دانه خربزه در غنی‌سازی سس مایونز کم‌چرب عملگرا و ارزیابی خواص رئولوژیکی آن

فائزه قورچ بیگی[۱]- علیرضا رحمن[۲*]- فاطمه حسینمردی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۷/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۶

چکیده

در این تحقیق نیز به‌منظور استفاده بهینه از ضایعات محصولات کشاورزی و همچنین تهیه و فرمولاسیون سس رژیمی و فراسودمند از ضایعات کشاورزی، پوست سبز پسته و دانه خربزه به صورت آرد با اندازه ذرات ۱۰۰ میکرومتر استفاده گردید. در این تحقیق، پودر پوست پسته در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵ و آرد دانه خربزه با غلظت‌های ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰ و ۳۶ درصد تهیه و فرموله شدند. تیمارهای سس مایونز در بازه‌های زمانی تولید (صفر)، ۳۰، ۶۰، و ۹۰ روز نگهداری مورد آزمایش‌های pH، درصد رطوبت، پروتئین، خاکستر، شاخص‌های رنگ‌سنجی (روشنایی، قرمزی، زردی)، ویسکوزیته، جمعیت میکروبی کل، آزمون پایداری و اندازه ذرات ارزیابی شد. ارزیابی حسی برای مؤلفه‌های (رنگ ظاهری، طعم، بافت، مالش‌پذیری، قوام، پذیرش کلی) انجام شد. نشان داد که با افزایش میزان پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه میزان پروتئین، رطوبت، pH، خاکستر، ویسکوزیته و اندازه ذرات افزایش یافت و همچنین در مقادیر بالای ۰/۱ درصد پوست پسته و ۶ درصد آرد دانه خربزه، جمعیت میکروبی کل و آزمون پایداری تیمارهای سس مایونز کاهش معنی‌داری داشت ($p\leq ۰/۰۵$). همچنین با افزایش زمان نگهداری نیز درصد رطوبت و پایداری سس مایونز و اندازه ذرات افزایش یافت ($p\leq ۰/۰۵$). کلیه امتیازات حسی تیمارهای سس مایونز در طی مدت زمان نگهداری کاهش یافت و نهایتاً تیمار T_1 با ۰/۱ درصد جایگزینی پودر پوست سبز پسته و ۶ درصد آرد دانه خربزه به‌عنوان تیمار بهینه و تیمار T_6 با ۰/۷۵ درصد جایگزینی پودر پوست سبز پسته و ۳۶ درصد آرد دانه خربزه به‌عنوان بدترین انتخاب شد.

واژه‌های کلیدی: ضایعات کشاورزی، سس مایونز کم‌چرب، غنی‌سازی.

مقدمه

امروزه در جوامع صنعتی ضایعات یکی از معضلات زندگی بشر است. بر اساس آمارهای بین‌المللی، سالانه مقدار زیادی از تولیدات بخش کشاورزی بین ۱۰ تا ۵۰ درصد به صورت ضایعات از چرخه خارج می‌شود که این مقدار محصول می‌توانست به سهم خود غذای جمعیت زیادی را تأمین کند. این در حالی است که روزانه در حدود ۵۰ هزار نفر در دنیا در اثر گرسنگی می‌میرند. در کشور ما به دلیل مشکلات موجود در سیستم نگهداری، تبدیل و توزیع، مقداری از محصولات کشاورزی ضایع می‌شود. به طوری‌که به‌طور متوسط ۳۵ درصد از محصولات کشاورزی در ایران و در مراحل گوناگون ضایع می‌شوند و این مقدار غذای ۱۵ تا۲۰ میلیون نفر از جمعیت کشور است (Statistics of Ministry of Agriculture, 2010). خطر کاهش مواد غذایی موجود در طبیعت و افزایش روزافزون جمعیت و ترس از عدم جایگزینی مواد مورد استفاده به‌خصوص غذا برای انسان، توجه بسیاری از محققین کشورهای جهان را به استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی به‌خصوص در زمینه صنایع مواد غذایی را به‌خود معطوف کرده است. با زیانی مواد زاید صنایع مواد غذایی و کشاورزی می‌تواند در بسیاری از موارد، راه‌گشای حل مشکلات کمبود مواد غذایی در طبیعت باشد (Zweigle, 2010).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران.
۳- مربی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: alireza_rahman@yahoo.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68966.1022

ضایعات کشاورزی در سه مرحله پیش از برداشت، برداشت و پس از آن روی می‌شوند ولی قسمت عمده ضایعات مربوط به مراحل برداشت و توزیع محصولات می‌باشد. لیکن در کنار طرح‌های افزایش تولید، یکی از سیاست‌های دولت‌ها در امر امنیت غذایی، کاهش ضایعات محصولات کشاورزی است. امنیت غذایی محور استقلال اقتصادی و سیاسی هر کشوری است و این مسأله در کشورهای در حال توسعه که همواره مورد تهدیدات جهانی قرار می‌گیرند از اهمیت بالاتری برخوردار است. کاهش ضایعات محصولات کشاورزی سبب افزایش در تولید آن‌ها بدون افزایش در سطح زیر کشت آن‌ها می‌شود که این امر فشار کمتری به محیط زیست وارد می‌کند (Mohammadi moghadam et al., 2009). با کاهش ضایعات محصولات کشاورزی هزینه‌های تولید کاهش و کیفیت محصولات افزایش می‌یابد، به دنبال آن درآمد تولیدکنندگان به‌ویژه کشاورزان خرده پا افزایش می یابد و وضعیت تغذیه ای مردم با افزایش دسترسی آن‌ها به محصولات کشاورزی اصلاح و بهبود می‌یابد.

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش تقاضا برای غذاهای کم‌چرب، صاحبان صنایع درصدد تولید این نوع غذاها با ظاهر و ویژگی‌های ظاهری محصولات پرچرب برآمده و فرآورده‌های جایگزین چربی را به بازار ارائه کرده‌اند (Malakoutian et al., 2013). این محصولات و ترکیبات، ویژگی‌های حسی و کاربردی چربی‌ها را دارند، ولی از نظر شیمیایی در گروه چربی‌ها قرار نمی‌گیرند و انرژی کمتری نسبت به چربی‌ها دارند. این ترکیبات ممکن است دارای چند یا تمامی ویژگی‌های چربی‌ها باشند. کاربرد آرد دانه خربزه و امولسیفایر لستین به‌عنوان جایگزین چربی در تولید بیسکوئیت کم‌چرب را بررسی نمودند. آرد دانه خربزه به‌خصوص در سطح ۱۰ درصد در کنار ۰/۳ درصد امولسیفایر لستین قابلیت جایگزینی با کل روغن موجود در بیسکوئیت را جهت تولید محصولی رژیمی و کم‌چرب داشت (Haghayegh & Zavehzad., 2017). در اینجا موضوع جایگزین کردن بخشی از روغن با موادی که بتوانند همان نقش روغن را در ماده غذایی ایفا نمایند و تأثیری بر خصوصیات ارگانولپتیکی ایجاد نکنند، ولی دارای کالری کمتری باشند، مطرح می‌شوند که تولید مایونز کم‌چرب یکی از این موارد می‌باشد (Agullo et al., 2003).

امروزه استفاده از فرآورده‌های جانبی و ضایعات مواد غذایی توجه بسیاری از محققان را به‌خود جلب نموده است. تنها بخشی از مواد گیاهی مستقیماً جهت مصرف انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد و مابقی آن یا به‌عنوان ضایعات دفع گردیده یا به صورت کود و غذای دام به‌کار می رود. بنابراین استفاده از این ضایعات در سایر فرآورده‌ها یا اعمال فرآیندهای تکمیلی بر روی آن‌ها جهت تولید فرآورده‌های جدید با ارزش افزوده می‌تواند در کاهش دورریز این مواد مؤثر باشد. به‌عنوان مثال هندوانه، کدو، طالبی و خربزه بعد از جداسازی پالپ، پوست و گوشت می‌تواند در سایر فرآورده‌های نانوایی، نوشیدنی‌ها، سوپ‌ها، فرآورده‌های گوشتی به‌عنوان مکمل یا بهبود دهنده مورد استفاده قرار گیرد (Matsakidou et al., 2010). در سال‌های اخیر روند توسعه باغات پسته در ایران قابل توجه بوده و هر ساله مقادیر زیادی پسته در این باغات تولید و عرضه می‌شود. این تولید بالا همراه با پسماندهایی است که معمولاً بی‌استفاده بوده و تا به حال برنامه مناسبی برای فرآوری و استفاده مجدد از ضایعات نزدکشاورزان و دامداران وجود نداشته است. با توجه به این‌که تقریباً از هر ۳ کیلو پسته تازه، حدود یک کیلوگرم پسته خشک به‌دست می‌آید و قابل مصرف و دو کیلوگرم آن به تبدیل به ضایعات می‌شود، بنابراین میزان پسماندهای سالانه این محصول در کشور بسیار بالا و نگران‌کننده خواهد بود (Darvishian., 2008). دانه خربزه به‌عنوان دانه روغنی مناطق گرمسیری به دلیل دارا بودن ویژگی های تغذیه‌ای مفید، محتوی چربی (با کلسترول کم و اسید چرب غیراشباع بالا) و پروتئین با کیفیت و ویژگی‌های عملکردی مناسب و حاوی اسیدهای آمینه ضروری بالا، در صنعت غذا مطرح شده است (Ladjane et al., 2000). از طرفی به دلیل کم کاربرد بودن آن، تاکنون به‌عنوان ضایعات به‌کار می‌رفته است. با توجه به مجموعه ترکیبات موجود در دانه خربزه و خواص مربوط به آن‌ها و داشتن مزایایی نظیر مواد مغذی بالا، فقدان عوامل حساسیت‌زا ، قابلیت هضم آسان و فرآوری ساده، هزینه‌های کم تولید و مصرف، استفاده از آن در مواد غذایی مختلف منطقی می‌باشد (Wien, 2004). با توجه به مطالعات Darvishian (۲۰۰۸) هر دو ترکیب پودر سبز پوست پسته و آرد دانه خربزه ترکیبات سرشار از فیبر بوده که می‌توانند با حضور در سس مایونز آن را به محصول فراسودمند تبدیل نمایند (Darvishian, 2008).

مایونز، یکی از قدیمی‌ترین سس‌ها به شمار می‌رود که به‌طور گسترده در سراسر جهان مصرف می‌شود. طبق تعریف استاندارد ملی ایران، مایونز نوعی امولسیون روغن در آب است که از امولسیون شدن روغن‌های خوراکی گیاهی (حداقل ۶۶ درصد) در یک فاز مایع حاوی سرکه و توسط زرده تخم‌مرغ ایجاد می‌شود که رنگ آن کرم تا زرد کمرنگ است و pH آن نباید از ۴/۱ تجاوز نماید. این فرآورده به‌طور سنتی از مخلوط نمودن زرده تخم‌مرغ، سرکه و ادویه‌جات (به‌ویژه خردل) به‌دست می‌آید. به علاوه مایونز ممکن است حاوی ترکیباتی مانند: نمک، شکر یا سایر شیرین کننده‌ها و یا افزودنی‌های مجاز دیگر نیز باشد (Amiri Oghdaei et al., 2010). Mohammadi Moghadam و همکاران در سال ۲۰۰۸، ضایعات پوست سبز پسته را در فرمولاسیون مارمالاد استفاده نمودند. نتایج خواص شیمیایی و حسی نشان داد با افزایش درصد پوست سبز پسته اسیدیته و سفتی مارمالاد افزایش پیدا می‌کند، در حالی‌که رنگ، قوام، مالش پذیری و پذیرش کل

کاهش یافت و افزایش درصد پکتین باعث افزایش سفتی مارمالاد شد (Mohammadi moghadam et al., 2009). Haghayegh و Zaveh zad (۲۰۱۷) استفاده از آرد دانه خربزه به عنوان مقلد چربی در تولید کیک کم‌چرب و بررسی خصوصیات کمی و کیفی محصول نهایی را بررسی نمودند و دریافتند که سطح ۱۰ درصد از آرد کامل دانه خربزه می‌تواند با حفظ کمیت و کیفت محصول تولیدی، جایگزین مناسبی برای روغن موجود در فرمولاسیون اولیه کیک روغنی باشد (Haghayegh & Zaveh zad., 2017). هدف از این پژوهش استفاده از این ضایعات در تولید سس مایونز با فرمولاسین جدید می‌باشد. هدف از این پژوهش استفاده از ضایعات پوست پسته و دانه خربزه در تولید سس مایونز کم‌چرب با هدف تولید محصولات فراسودمند و بهره‌گیری از ضایعات کشاورزی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق مواد اولیه مانند روغن سویا از شرکت عالیا گلستان، تخم‌مرغ از شرکت تلاونگ، ادویه‌جات از شرکت گل‌ها، نشاسته اصلاح شده از شرکت گلوکوزان قزوین و سرکه سفید از شرکت وردا تهیه شد. پوست سبز پسته رقم اکبری نیز از مؤسسه تحقیقات پسته تهیه شد. دانه‌های خربزه نیز رقم خاقانی مربوط به نواحی کشاورزی استان البرز، از بازار تهیه شد.

فرآوری دانه خربزه

دانه‌های خربزه برای این پژوهش از خربزه‌های رقم خاقانی مربوط به نواحی کشاورزی استان البرز، از بازار تهیه شده و با کمک ماده ضدعفونی بنزوالکونیوم با غلظت ۴ درصد و آب شستشو گردید. سپس دانه‌های شسته شده در معرض نور آفتاب خشک و در مرحله بعد دانه های خشک شده تا رطوبت ۱ درصد، به کمک آسیاب صنعتی، آرد شد. عوامل مؤثر در افزایش کیفیت آرد مورد استفاده، شامل استفاده از دانه کامل(مغز و پوسته دانه)، کیفیت دانه انتخاب شده (نوع رقم و ترکیب شیمیایی دانه)، کنترل شرایط در هنگام آسیاب کردن می‌باشد. برای آسیاب شدن موفق دانه‌ها، به دلیل چربی بالای دانه و وجود پوسته‌ها، امکان چسبندگی وجود دارد، پس دانه‌ها باید کاملاً خشک بوده و قدرت آسیاب نیز بالا باشد (Abedini et al., 2009).

جدول ۱- تیمار سس مایونز شاهد (مطابق استاندارد ملی سس مایونز به شماره ۲٤٥٤)

Table 1- Mayonnaise treatment (according to the national mayonnaise standard number 2454)

Percentage (weight/weight) درصد(وزنی/وزنی)	Compound ترکیبات	Row ردیف
36/00	Soy oil روغن سویا	1
10/00	Water آب	2
35/80	Vinegar سرکه	3
8/00	Sugar شکر	4
4	Mustard خردل	5
0/40	Salt نمک	6
2/00	The keeper نگهدارنده	7
0/10	Xanthan زانتان	8
0/20	Modified starch نشاسته اصلاح شده	9
2/50	Egg powder پودر تخم مرغ	10

فرآوری پودر پوست پسته

پوست پسته پس از جداسازی از مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان تهیه شد. ابتدا پوست پسته‌ها در سایه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رسیدن به رطوبت ۱ درصد خشک شد. سپس پوست‌های خشک شده با استفاده از آسیاب خرد گردید و نمونه‌های پوست پسته خشک شده، آسیاب شده الک گردید. نمونه‌ی مورد استفاده برای آزمایش‌های مرحله استخراج دارای اندازه ذرات بین ۰/۵ تا ۲ میلی‌متر بود. نمونه‌های الک شده تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و با کمک ماده ضدعفونی بنزوالکونیوم با غلظت ۴ درصد و آب شستشو گردید. سپس دانه‌های شسته شده در معرض نور آفتاب خشک و در مرحله بعد دانه‌های خشک شده، به کمک آسیاب صنعتی، آرد شد. ذرات با استفاده از مش ۱۰۰ میکرو الک شده و سپس در فرمولاسیون تیمارهای سس مایونز استفاده شد.

تهیه و فرمولاسیون سس مایونز

به‌منظور تهیه نمونه‌های سس مایونز ابتدا آب، مواد پودری (شامل نمک، شکر، ادویه‌جات، و صمغ زانتان) و پودر تخم‌مرغ درون همزن ریخته شد و پس از اختلاط کامل (به مدت ۲ دقیقه) ابتدا روغن به تدریج و به صورت قطره قطره و پس از آن به صورت لایه‌ای باریک طی مدت ۷ دقیقه اضافه شد. در انتها و پس از تشکیل امولسیون با بافت مناسب به تدریج سرکه به مخلوط اضافه گردید. مخلوط نهایی با استفاده از هموژنایزر (اولتراتوراکس، تی ۸۱۰،آلمان) با دور بالا (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۵ دقیقه همگن شد. نمونه‌های سس مایونز تهیه شده در این تحقیق مطابق با جدول ۱ تیمارهای تحقیق نامگذاری شد و لازم به ذکر است که برای هر تیمار مقدار یک کیلوگرم نمونه تهیه شد.

آزمون‌های سس مایونز

برای اندازه‌گیری درصد رطوبت مطابق با استاندارد ملی ۲۴۵۴ سس مایونز از روش آون گذاری استفاده شد. کلیه آزمون‌های سس مایونز در روزهای اول، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ پس از تولید انجام گرفت. اندازه گیری درصد خاکستر تیمارهای سس مایونز با استفاده از روش سوزاندن نیز مطابق با استاندارد ملی ۳۴۷۴ سس مایونز صورت پذیرفت. pH سس مایونز تولید شده در این پژوهش به‌وسیله pH متر (متروم، ۶۹۱، سوئیس) با استفاده از استاندارد ملی ایران اندازه‌گیری شد.

ارزیابی پایداری نمونه‌ها

پایداری نمونه‌های مایونز در طول روزهای اول، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ اندازه‌گیری شد به این صورت که ۲۵ گرم نمونه در لوله سانتریفوژ توزین و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) گردید، سپس نمونه‌های سانتریفوژ شده به مدت ۴۸ ساعت در آون (۵۰ درجه سانتیگراد) قرار داده شد و پس از این مرحله لایه روغن جدا شده از مایونز دور ریخته شد. در نهایت پایداری امولسیون بر حسب درصد و با استفاده از معادله زیر تعیین شد.

(۱) پایداری امولسیون = (وزن اولیه نمونه/ وزن نمونه سانتریفوژ) ×۱۰۰

ارزیابی ویژگی‌های رئولوژیکی

به‌منظور تعیین ویژگی‌های رئولوژیکی نمونه‌های مایونز، از دستگاه ویسکومتر بروکفیلد (II-DV RV، امریکا) استفاده شد. برای این منظور از اسپیندل شماره ۷ استفاده گردید. برای اندازه‌گیری ویسکوزیته، مقدار مورد نیاز نمونه (۵۰۰ میلی‌لیتر) درون بشر ۶۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و اسپیندل تا خط نشانه وارد نمونه شد. سپس ویسکوزیته ظاهری نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در سرعت‌های چرخش ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۰۵، ۱۲۰، ۱۳۵، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ rpm اسپیندل اندازه‌گیری گردید (Aslanzadeh *et al.*, 2012).

اندازه‌گیری میانگین اندازه ذرات نمونه‌های مایونز

نمونه‌های مایونز با محلول ۰/۵ درصد سدیم دودسیل سولفات[1] با نسبت ۱:۱۰۰ رقیق و سپس اندازه ذرات (میکرومتر) و سطح مخصوص (m^2/CC) سنجش اندازه ذرات برای هر نمونه با استفاده از دستگاه (Sizer Fritsch Particle، ANALYSETTE 22 NeXT، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت (Aslanzadeh *et al.*, 2012).

آزمون رنگ‌سنجی

برای بررسی دقیق‌تر اثر غلظت‌های متفاوت ضایعات پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه بر شاخص‌های رنگ نمونه‌های سس مایونز تولیدی، پس از گذشت یک هفته از زمان تولید از اسپکتروفتومتر (ColorFlex45.0 Hunter Lab، آلمان) مطابق با روش ارائه شده توسط کمپانی هانترلب استفاده شد (Matsakidou et al., 2010) .

آزمون شمارش کلی نمونه‌های سس مایونز تولیدی

آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها مطابق استاندارد ملی شماره ۲۹۶۵ و به روش کشت آمیختنی با ۲ بار تکرار و گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ±۷۲ ساعت انجام شد. آزمون میکروبی تیمارهای تولیدی در فواصل زمانی صفر ساعت (بلافاصله پس از تولید)، ۲۴ ساعت، ۱، ۲ و ۳ ماه پس از تولید و در ۳ رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و به ازای هر رقت ۲ بار کشت میکروبی انجام شد (National Standard No. 2965, 2015).

ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی نمونه‌های مایونز، پس از انجام آزمون‌های اولیه ۱۰ داور تعلیم دیده به‌عنوان استفاده شد، به این صورت که سه نمونه ارزیاب انتخاب شد. برای ارزیابی نمونه‌های اصلی از مقیاس هدونیک ۵ نقطه‌ای استفاده شد. به این ترتیب ۷ فاکتور تأثیرگذار سس مایونز شامل ظاهر (درخشندگی، شفافیت)، رنگ (مطلوبیت رنگ معمول مایونز و رنگ کرمی بودن)، طعم (طعم استاندارد سس مایونز)، قوام، بافت (یکنواختی و غیریکنواختی)، مالش‌پذیری و پذیرش کلی مورد ارزیابی قرار گرفت (National Standard No. 2965, 2015).

1 Sodium dodcyle Solphate

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SAS (2001) تجزیه و تحلیل شد. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. همه تیمارها و آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام گرفت.

جدول ۲- کدبندی تیمارهای سس مایونز

Table 2- Coding's of mayonnaise treatments

Melon seed flour replacement percentage آرد دانه خربزه درصد جایگزینی	Green pistachio skin powder replacement percentage پودر پوست سبز پسته درصد جایگزینی	Oil percentages درصد روغن	Modified starch نشاسته اصلاح شده	Treatment code کد تیمار	Row ردیف
0	0	36	0.1	**T0**	**1**
6	0.1	30	0	**T1**	**2**
12	0.1	24	0	**T2**	**3**
18	0.5	18	0.05	**T3**	**4**
24	0.5	12	0.05	**T4**	**5**
30	0.75	6	0.025	**T5**	**6**
36	0.75	0	0.025	**T6**	**7**

نتایج و بحث

تغییرات درصد رطوبت تیمارهای سس مایونز

همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود با افزایش میزان درصد استفاده از پودر پوست پسته و پودر مغز دانه خربزه میزان درصد رطوبت تیمارهای سس مایونز در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p\leq$ ۰/۰۵). همچنین زمان نیز تأثیرات معنی‌داری بر میزان درصد رطوبت تیمارهای سس مایونز نشان داد ($p\leq$ ۰/۰۵). با افزایش مدت زمان نگهداری از روز تولید تا ۹۰ روز، کاهش معنی‌داری در میزان درصد رطوبت کلیه تیمارها مشاهده شد ($p\leq$ ۰/۰۵). در بین تیمارهای سس مایونز با مقادیر بالاتر پودر پوست پسته و همچنین پودر مغز دانه خربزه میزان درصد رطوبت تیمارهای سس مایونز در طی مدت زمان نگهداری، با کاهش بیشتری مواجه می‌باشد. بررسی نتایج ارزیابی درصد رطوبت نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در میزان درصد رطوبت تیمارهای سس مایونز بود یکی از دلایل این تغییرات به جهت بالا رفتن حضور ترکیبات فیبری و افزایش ماده خشک در فرمولاسیون سس مایونز می‌باشد که این ترکیبات قادر به احتباس مولکول های آب موجود در ساختار سس مایونز و همچنین کاهش میزان درصد پیوستگی لایه های مولکول‌های آب به‌خصوص آب آزاد ماده غذایی می‌باشد (Aslanzadeh *et al.*,2012)، که با افزایش درصد پودر پوست پسته و مغز دانه خربزه به جهت افزایش میزان درصد ترکیبات فیبری میزان درصد رطوبت به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد و میزان این کاهش درصد رطوبت، در مقادیر بالاتر استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه کاهش بیشتری مواجه بود. در راستای افزودن ترکیبات پودری به سس مایونز و ارزیابی تأثیرات آن بر میزان درصد رطوبت تیمارهای سس مایونز نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت. Shirmohammadi و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی در فرمولاسیون سس مایونز فراسودمند با افزودن پودر دانه بزرگ را بررسی نمودند و دریافتند که استفاده از پودر دانه بزرگ تأثیرات معنی‌داری بر میزان درصد رطوبت تیمارهای سس مایونز به‌خصوص در مقادیر بالای استفاده داشته و میزان درصد رطوبت را کاهش داد که با یافته‌های تحقیق حاضر نیز همخوانی داشت (Shirmohammadi et al., 2015). Mesbahi و همکاران در سال ۲۰۰۹ در بررسی افزودن پوست و دانه گوجه‌فرنگی به سس کچاپ به‌منظور بهبود ارزش غذایی و خصوصیات رئولوژیک آن نیز دریافتند که افزودن این ترکیبات میزان درصد رطوبت را کاهش داده و میزان ماده خشک را به‌طور معنی‌داری افزایش داد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌راستا بود (Mesbahi et al., 2009).

تغییرات درصد خاکستر تیمارهای سس مایونز

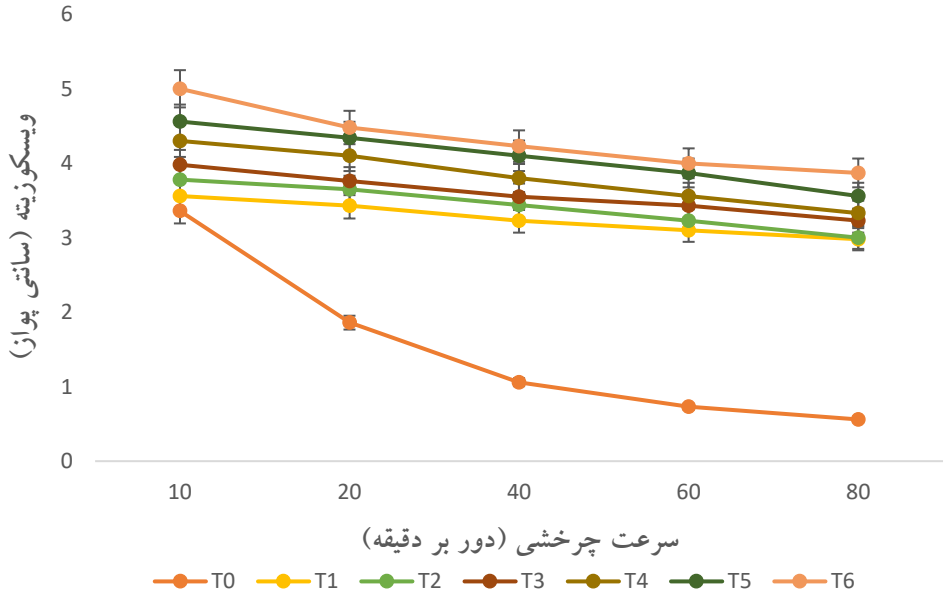
با توجه به شکل ۱ مشاهده شد که اختلافات معنی‌داری بین میزان درصد خاکستر تیمارهای سس مایونز با توجه به اختلاف در تیمار (مقادیر پودر پوست پسته و پودر مغز دانه خربزه) وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود با افزایش میزان درصد استفاده از پودر پوست پسته و پودر مغز دانه خربزه میزان درصد خاکستر تیمارهای سس مایونز در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی داری را نشان داد ($p\leq$۰/۰۵). همچنین زمان نیز تأثیرات معنی‌داری بر میزان درصد خاکستر تیمارهای سس مایونز نشان نداد ($p>$۰/۰۵). پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه دارای مقادیر بالایی فیبر ۴/۳ و درصد خاکستر ۴/۸ می‌باشند که باعث افزایش درصد خاکستر تیمارهای سس مایونز می‌شود. در این راستا Najafi و Sharifi (۲۰۰۹) در زمینه ترکیبات شیمیایی موجود در دانه خربزه بـه ایـن نتیجه دست یافتند که

دانه خربزه دارای حدود ۴/۲ درصد مواد معدنی است که این مواد شامل گوگرد، کلسیم، منگنز، فسفر، آهن و روی می‌باشد. از این‌رو افزایش میزان خاکستر در سس مایونز کم‌چرب حاوی آرد دانه خربزه امری بدیهی به‌نظر می‌رسید. از سوی Shahidi و همکاران (۲۰۰۶) با مطالعه در زمینه ترکیبات موجود در مغز دانه صیفی‌جات (نظیر خربزه، طالبی، هندوانه و کدو) به نتایج مشابهی دست یافتند و اذعان نمودند حضور این ترکیبات در مغز دانه‌ها در مواد غذایی به دلیل دارا بودن مواد معدنی در افزایش میزان خاکستر اثرگذارست که نتایج پیش رو نیز گواهی بر این امر می‌باشد (Shahidi et al., 2006). Nasrabadi و Daryadar (۲۰۱۷) اثر آرد دانه خربزه بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، فارینوگرافی و بیاتی نان سنگک بررسی نمودند و اذعان داشتند که آرد دانه خربزه میزان درصد خاکستر تیمارهای نان سنگک را افزایش می‌دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر نیز هم‌راستا می‌باشد (Nasrabadi & Daryadar, 2017). همچنین Nasrabadi & Nikfarjam در سال ۲۰۱۹ اثر افزودن آرد دانه خربزه بر خواص کمی و کیفی نان تست بررسی نمودند. آن‌ها دریافتند که آرد دانه خربزه میزان درصد خاکستر تیمارهای نان تست را افزایش می‌دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر نیز هم‌راستا می‌باشد.

شکل ۱- مقایسه میانگین درصد خاکستر تیمارهای سس مایونز
Fig. 1. Comparison of average ash percentage of mayonnaise treatments

تغییرات میزان ویسکوزیته تیمارهای سس مایونز

با توجه به شکل ۲ مشاهده شد که با افزایش میزان پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه میزان ویسکوزیته تیمارهای سس مایونز افزایش معنی‌داری نشان داد ($p\leq۰/۰۵$). به‌طور کلی با افزایش سرعت چرخشی میزان ویسکوزیته تیمارهای سس مایونز کاهش معنی‌داری نشان داد ($p\leq۰/۰۵$). در بین تیمارهای سس مایونز تیمارهای دارای مقادیر بالاتر پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه دارای میزان ویسکوزیته بالاتری بودند و با افزایش میزان سرعت برشی اسپیندل میزان ویسکوزیته بالاتری نسبت به تیمار شاهد داشتند که میزان این تغییرات در مقایسه با تیمار شاهد به وضوح در تیمار T_6 قابل مشاهده می‌باشد. به نظر می‌رسد که امولسیون‌ها با قرارگیری پروتئین در اطراف قطرات روغن که موجب جلوگیری از هم‌آمیختگی ذرات می‌شود، پایدار می‌شوند. در واقع پروتئین نقش امولسیون کننده و پایدارکننده دارد. پلی‌ساکاریدها مانند صمغ، نقش پایدارکننده داشته و عمل خود را از طریق افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته و کاهش حرکت قطرات روغن ایفا می‌کنند. در این تحقیق نیز استفاده از پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه، میزان ویسکوزیته را به‌طور معنی‌داری افزایش داد، به‌طور کلی حضور ترکیبات فیبری مانند سپری بین بارهای ناهمنام عمل کرده و میزان اتصالات داخلی تیمارهای سس مایونز را افزایش داده و همچنین تیمار سس مایونز دارای فیبر از میزان وزن بالاتری در مقایسه با تیمار شاهد برخوردار است که میزان ویسکوزیته تیمارهای سس مایونز را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد و با افزایش میزان ویسکوزیته سس مایونز، شاخص میزان چسبندگی افزایش و همچنین میزان شاخص انسجام به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq۰/۰۵$). Rahbari و همکاران (۲۰۱۳) نیز در بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و حسی سس مایونز حاوی ایزوله پروتئین جوانه گندم و صمغ زانتان به‌عنوان جایگزین تخم‌مرغ نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آن‌ها دریافتند که استفاده از ایزوله پروتئین جوانه گندم میزان ویسکوزیته سس مایونز را افزایش می‌دهد که با نتایج تحقیق حاضر نیز همراستا می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه میانگین شاخص ویسکوزیته تیمارهای سس مایونز در طی ۹۰ روز نگهداری

Fig. 2. Comparison of average viscosity index of mayonnaise treatments during 90 days of storage

تغییرات میزان pH تیمارهای سس مایونز

با توجه به جدول ۳ مشاهده شد که افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و مغز دانه خربزه میزان pH تیمارهای سس مایونز را به طور معنی‌داری افزایش داد (p≤۰/۰۵). بالاترین میزان کاهش شاخص pH به تیمار دارای بالاترین میزان پودر پوست پسته و مغز دانه خربزه و کمترین آن به تیمار سس مایونز شاهد تعلق داشت (p≤۰/۰۵). در طی زمان نگهداری ۹۰ روزه نیز میزان شاخص pH در کلیه تیمارهای سس مایونز افزایش معنی‌داری را نشان داد به‌طوری‌که کمترین میزان شاخص pH در روز تولید و بالاترین آن در روز نود نگهداری مشاهده شد (p≤۰/۰۵). اسیدیته و pH از فاکتورهای شیمیایی بسیار مهم در سس‌های سالاد از جمله مایونز می‌باشند که در استاندارد ملی ایران محدوده مشخصی برای آن‌ها تعریف شده است. بر طبق استاندارد ایران، pH مایونز نباید از ۴/۱ بیشتر و اسیدیته کل نباید از ۰/۶ بر حسب گرم در صد گرم اسید استیک کمتر باشد. زیرا افزایش pH ممکن است شرایط رشد باکتری‌های بیماری‌زا را فراهم کند و اگر اسیدیته از ۱/۵ درصد بیشتر باشد، مایونز حاصل طعمی نامطلوب پیدا می‌کند. اسیدیته بهینه ۱/۲ –۰/۷ درصد است (Moeini Feiz Abadi et al., 2012). میزان pH آرد دانه خربزه و پوست پسته حدوده ۶/۵–۶ می‌باشد که بالاتر از pH تیمارهای سس مایونز می‌باشد که بنابراین با افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه میزان pH تیمارهای سس مایونز به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (p≤۰/۰۵). در این زمینه برخی محققان اذعان داشتند که pH نمونه‌های سس کم‌چرب حاوی فیبر رژیمی سبوس گندم بیشتر از نمونه پرچرب آن بود (Aslanzadeh et al., 2012) که علت این امر کاهش pH با جانشین نمودن روغن با فیبر در سس مایونز را کاهش آب آزاد دانست .از این‌رو به‌نظر می‌رسد در پژوهش پیش‌رو چون از دانه کامل خربزه نه از مغز دانه آن به عنوان جایگزین روغن در فرمولاسیون اولیه سس مایونز استفاده شده است، پوسته دانه خربزه به عنوان یک منبع فیبری عاملی اثرگذار بر افزایش pH بوده است. در بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، تصویری، بافتی و حسی سس مایونز کم‌چرب حاوی آرد کامل دانه خربزه به نتایج مشابهی دست یافتند. آن‌ها اذعان داشتند که استفاده از آرد کامل دانه خربزه میزان شاخص pH تیمارهای سس مایونز را افزایش می‌دهد که با نتایج تحقیق حاضر نیز همخوانی داشت.

تغییرات مؤلفه‌های رنگ سنجی

با توجه به جدول ۳ مشاهده شد که افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و مغز دانه خربزه میزان شاخص روشنایی (L^*) تیمارهای سس مایونز را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (p≤۰/۰۵). کمترین میزان کاهش شاخص روشنایی (L^*) به تیمار دارای بالاترین میزان پودر پوست پسته و مغز دانه خربزه و بالاترین آن به تیمار سس مایونز شاهد تعلق داشت (p≤۰/۰۵). در طی زمان نگهداری ۹۰ روزه نیز میزان شاخص روشنایی (L^*) در کلیه تیمارهای سس مایونز کاهش معنی‌داری را نشان داد به‌طوری‌که بالاترین میزان شاخص روشنایی (L^*) در روز تولید و کمترین آن در روز نود نگهداری مشاهده شد (p≤۰/۰۵). با توجه به شکل مشاهده شد که اختلافات معنی‌داری بین میزان شاخص زردی تیمارهای سس مایونز با توجه به میزان استفاده از پودر پوست

پسته و آرد مغز دانه خربزه وجود داشت (p≤۰/۰۵). با افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه میزان شاخص زردی تیمارهای سس مایونز در روز تولید کاهش معنی‌داری را نشان داد (p≤۰/۰۵). زمان نیز تأثیرات معنی‌داری بر میزان شاخص زردی تیمارهای سس مایونز نشان داد (p≤۰/۰۵). در روز تولید میزان شاخص زردی تیمارهای سس مایونز در کلیه تیمارهای حداقل بوده اما در طی مدت زمان نگهداری ۹۰ روز میزان شاخص زردی تیمارهای سس مایونز به طور معنی‌داری تا روز ۹۰ افزایش معنی‌داری را نشان داد (p≤۰/۰۵). در انتهای روز ۹۰ میزان شاخص زردی در کلیه تیمارهای سس مایونز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p≤۰/۰۵). در تیمارهای سس مایونز با میزان بالاتر پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه با کاهش میزان شاخص زردی در روز تولید، در طی زمان نگهداری ۹۰ روز کاهش تدریجی کمتری را نسبت به تیمارهای سس مایونز با میزان کمتر و همچنین تیمار شاهد تجربه کرد (p≤۰/۰۵). با توجه به شکل مشاهده شد که استفاده از پودر پوست پسته و پودر مغز دانه خربزه در مقایسه با تیمار شاهد می‌تواند شاخص قرمزی تیمارهای سس مایونز را کاهش دهد (p≤۰/۰۵). در روز تولید سس مایونز تیمار با افزایش میزان پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه شاخص قرمزی تیمارهای سس مایونز کاهش معنی‌داری داشت (p≤۰/۰۵). زمان نیز تأثیرات معنی‌داری بر میزان شاخص قرمزی تیمارهای سس مایونز داشت (p≤۰/۰۵). در روز تولید میزان شاخص قرمزی در کلیه تیمارها در بالاترین میزان خود وجود داشت اما در طی زمان نگهداری تا ۹۰ روز به حداقل رسید (p≤۰/۰۵). به‌طوری‌که در انتهای روز ۹۰ نگهداری میزان شاخص قرمزی در حداقل میزان ممکن مشاهده شد (p≤۰/۰۵). بررسی نتایج ارزیابی شاخص رنگ‌سنجی نشان داد که استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه میزان شاخص روشنایی*L تیمارهای سس مایونز را کاهش می‌دهد (p≤۰/۰۵). دلیل این تغییرات در شاخص روشنایی*L را می‌توان به رنگ‌های دو ترکیب پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه مرتبط دانست. با افزایش میزان استفاده از این دو ترکیب میزان شاخص روشنایی *L با کاهش بیشتری مواجه می‌باشد. با افزایش جایگزینی روغن موجود در سس مایونز با آرد دانه خربزه از میزان مؤلفه رنگی *L کاسته و بر میزان مؤلفه های رنگی *b افزوده شد. در اینجا به نظر می‌رسد کاهش مؤلفه رنگی *L نمونه سس‌های کم‌چرب نسبت به نمونه شاهد در ارتباط مستقیم با بافت محصول باشد و از آنجا که با جایگزینی بخشی از روغن موجود در فرمولاسیون با آرد دانه خربزه بافت منسجم‌تر و فشرده‌تر می گردد. در نتیجه می‌تواند این احتمال وجود داشته باشد که شاخص روشنایی *L کاهش یابد. در طی زمان نگهداری با افزایش میزان سفتی بافت تیمارهای سس مایونز ناشی از دست دادن رطوبت می‌تواند میزان شاخص روشنایی *L به‌طور معنی‌داری کاهش یابد. همچنین شاخص زردی *b تیمارهای سس مایونز به جهت رنگ آرد دانه خربزه و پودر پوست پسته افزایش می‌یابد. با توجه به رابطه عکس بین میزان شاخص زردی *b و قرمزی میزان شاخص قرمزی تیمارهای سس مایونز نیز کاهش معنی‌داری را تجربه نمود (p≤۰/۰۵). Zarei & Ghiafeh davoodi در سال ۲۰۱۶ در بررسی کاربرد آرد کامل دانه خربزه به‌عنوان جایگزین بخشی از چربی موجود در فرمولاسیون سس مایونز کم‌چرب نیز به کاهش میزان شاخص روشنایی *L و افزایش شاخص زردی *b اشاره نمودند که با یافته‌های تحقیق حاضر نیز مطابقت دارد.

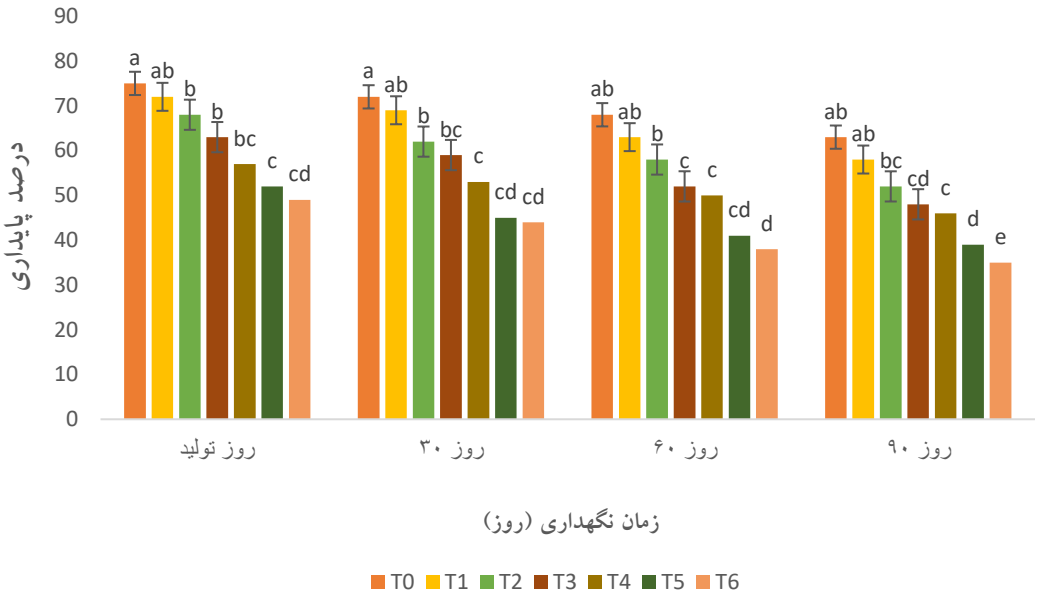
تغییرات اندازه ذرات

با توجه به جدول ۳ مشاهده شد که اختلافات معنی‌داری بین میزان شاخص اندازه ذرات تیمارهای سس مایونز معنی‌داری وجود داشت (p≤۰/۰۵). به‌طور کلی با افزایش میزان استفاده از پودر مغز دانه خربزه و همچنین پودر پوست مغز پسته میزان اندازه ذرات سس مایونز افزایش معنی‌داری داشت به‌طوری‌که کمترین میزان اندازه ذرات سس مایونز در تیمار شاهد T_0 و بالاترین میزان اندازه ذرات در تیمار سس مایونز T_6 مشاهده شد (p≤۰/۰۵). همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود زمان نیز تأثیر معنی‌داری بر میزان شاخص اندازه ذرات تیمارهای سس مایونز داشت (p≤۰/۰۵). در طی زمان نگهداری میزان شاخص اندازه ذرات در کلیه تیمارهای سس مایونز تا انتهای روز ۹۰ نگهداری افزایش یافت (p≤۰/۰۵). میزان افزایش اندازه ذرات سس مایونز در تیمار سس مایونز شاهد کمتر از سایر تیمارها بود (p≤۰/۰۵). بالاترین میزان تغییرات در سس مایونز شاهد دارای بالاترین میزان پودر پوست پسته به میزان ۰/۷۵ و پودر مغز دانه خربزه به میزان ۳۶ درصد (تیمارT_6) مشاهده شد (p≤۰/۰۵). افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه در فرمولاسیون سس مایونز میزان اندازه ذرات را افزایش داد و میزان این افزایش اندازه ذرات با افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (p≤۰/۰۵). با افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه میزان واکنش‌ها و فعل و انفعال‌های بین ذرات گلبول‌های چربی سس مایونز و پروتئین و همچنین ترکیبات فیبری سس مایونز به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در این راستا با افزایش درصد پروتئین و ترکیبات فیبری ناشی از افزایش درصد جایگزینی نیز میزان ذرات سس مایونز به‌طور معنی‌داری افزایش و شاخص انسجام کاهش یافت. در طی زمان نگهداری نیز با کاهش میزان درصد رطوبت و کاهش میزان آب آزاد و پیوسته تیمارهای سس مایونز میزان سطح تماس ذرات سس مایونز افزایش پیدا کرده و این مسأله موجب افزایش اندازه کلیه ذرات

در طی زمان گردید. علاوه بر این به دلیل افزایش میزان درصد ته‌نشینی ذرات، کاهش پایداری و افزایش فلوکولاسیون میزان درصد اندازه ذرات سس مایونز افزایش معنی‌داری یافت. Adeli Milani و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی اثر پودر خردل زرد بر گرانروی، پایداری تعلیق، تندی و ویژگی‌های حسی سس مایونز را بررسی نمودند و دریافتند که استفاده از پودر خردل زرد باعث افزایش اندازه ذرات در مقادیر بالای استفاده شده و همچنین پایداری امولسیون‌های سس مایونز را نیز کاهش داد (Adeli Milani et al., 2009). Moeini Feyz Abadi و همکاران (۲۰۰۹)، ویژگی‌های رئولوژیکی و بافتی سس مایونز حاوی صمغ دانه شاهی را بررسی نمودند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که ترکیبات فیبری صمغ دانه شاهی می‌تواند به‌طور معنی‌داری باعث افزایش اندازه ذرات سس مایونز گردید که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت (Moeini Feiz Abadi et al., 2012).

تغییرات پایداری نمونه‌های سس مایونز

با توجه به شکل ۳ مشاهده شد که اختلافات معنی‌داری بین میزان شاخص پایداری تیمارهای سس مایونز وجود داشت ($p\leq۰/۰۵$). با افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه میزان شاخص پایداری تیمارهای سس مایونز کاهش معنی‌داری یافت ($p\leq۰/۰۵$). به‌طوری‌که تیمار T_6 دارای کمترین میزان پایداری بود ($p\leq۰/۰۵$).



شکل ۳- مقایسه میانگین شاخص پایداری تیمارهای سس مایونز در طی ۹۰ روز نگهداری

Fig. 3. Comparison of the average stability index of mayonnaise treatments during 90 days of storage.

تیمار سس مایونز شاهد T دارای بالاترین میزان پایداری بوده و تیمار T_1 نیز اختلافات معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت ($p\leq۰/۰۵$). اما در مقادیر بالاتر از T_1 با تیمار شاهد اختلافات معنی‌داری مشاهده شد ($p\leq۰/۰۵$). در طی زمان نگهداری میزان شاخص پایداری تیمارهای سس مایونز کاهش معنی‌داری داشت ($p\leq۰/۰۵$). بالاترین میزان پایداری کلیه تیمارها در روز تولید و در روز نود نیز کمترین میزان شاخص پایداری تیمارهای سس مایونز مشاهده شد ($p\leq۰/۰۵$). یکی از شاخص‌های مهم در مورد سس مایونز پایداری امولسیونی در دماهای بالا است. علاوه بر اندازه ذرات و اختلاف دانسیته اجزای فرمول دو عامل مهم دیگر بر روی پایداری امولسیون، گرانروی و فشرده بودن ذرات امولسیون هستند که تأثیری به‌سزا در پایداری سس مایونز دارند (Moeini Feiz Abadi et al., 2012). با افزودن پوست پسته و آرد دانه خربزه، حالت امولسیونی تا حدودی تخریب می‌شد و احتمال می‌رفت که شاهد جداشدگی فاز روغنی باشیم که به احتمال زیاد به دلیل صنعتی بودن دستگاه هموژنایزر با سرعت چرخش بالا و همچنین به دلیل نقش خوب عوامل ثبات‌دهنده و تغلیظ‌کننده پایداری مناسبی را مشاهده شد. پدیده خامه‌ای شدن در نمونه‌های سس مایونز پرچرب که حاوی مقادیر کمتر پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه است، کمتر اتفاق افتاد که ممکن است، به این دلیل که قطرات روغن با یکدیگر تماس داشته و اصطکاک حاصل بین آن‌ها مانع از خامه‌ای شدن می‌شود. در حالی‌که در نمونه‌های با درصد بالای پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه، این پدیده معمول‌تر است. ولی می‌توان با افزودن عوامل قوام‌دهنده و جایگزین‌های چربی مناسب نظیر صمغ‌های مختلف، نشاسته اصلاح شده و غیره از این پدیده

جلوگیری کرد. سس مایونز کم‌چرب دارای ویسکوزیته پایینی است. به همین دلیل امکان رسوب پودر در دمای یخچال به‌عنوان شاخصی از فساد فیزیکی وجود داشت و در صورت رسوب، مقبولیت خود را از دست می‌داد. از این‌رو تمامی نمونه‌ها هر ۳۰ روز یکبار به لحاظ جداشدن روغن و رسوب ذرات پودری مورد بررسی قرار گرفتند که در نمونه کنترل نشانه‌ای از جدا شدن روغن و در نمونه‌های فراسودمند نشانه‌ای از روغن زدگی و رسوب پودر در طول زمان مشاهده نشد. این امر تاحدود زیادی به دلیل بالا بردن ویسکوزیته توسط پوست پسته و آرد دانه خربزه شده می‌باشد. Zarei & Ghiafeh Davoodi در سال ۲۰۱۵ در بررسی کاربرد آرد کامل دانه خربزه به‌عنوان جایگزین بخشی از چربی موجود در فرمولاسیون سس مایونز کم‌چرب به نتایج مشابهی دست یافتند. آن‌ها دریافتند که میزان پایداری سس مایونز در طی دوره نگهداری کاهش می‌یابد.

تغییرات مؤلفه‌های حسی

با توجه به شکل ۴ مشاهده شد که در طی زمان نگهداری از میزان مطلوبیت حسی ظاهری کلیه تیمارهای سس مایونز کاسته شد که به صورت کاهش درخشندگی و شفافیت تیمارهای سس مایونز مشهود بود ($p\leq۰/۰۵$). از نظر ارزیاب‌ها تیمار سس مایونز T_1 با مقادیر پودر پوست پسته ۰/۱ و پودر مغز دانه خربزه ۶ درصد امتیازاتی مشابه با تیمار شاهد در روز تولید نشان داد ($p\leq۰/۰۵$). این تیمار برتری امتیازات حسی خود را در طی بازه زمانی ۹۰ روز حفظ کرده و نهایتاً در ماه‌های انتهای نگهداری نسبت به تیمار شاهد از برتری بیشتری برخوردار بود. در بین سایر تیمارها نیز به تدریج با افزایش درصد استفاده از این دو ترکیب، مطلوبیت تیمار بعدی نسبت به قبلی با کاهش معنی‌داری مواجه بوده و به عبارت دیگر از نظر ارزیاب‌ها، میزان درخشندگی و شفافیت سس مایونز با افت معنی‌داری با افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و پودر مغز دانه خربزه مواجه شد. بررسی نتایج شکل حاکی از تغییرات امتیازات رنگ ظاهری و افت معنی‌دار آن از نظر ارزیاب‌ها بود ($p\leq۰/۰۵$). از نظر ارزیاب‌ها تیمار سس مایونز T_1 با مقادیر پودر پوست پسته ۰/۱ و پودر مغز دانه خربزه ۶ درصد امتیازات رنگ ظاهری مشابه با تیمار شاهد در روز تولید نشان داد ($P\leq۰/۰۵$).

در طی زمان نگهداری از میزان مطلوبیت حسی رنگ ظاهری کلیه تیمارهای سس مایونز کاسته شد که به صورت کاهش مطلوبیت رنگ ظاهری و کرمی بودن و رنگ معمول تیمارهای سس مایونز مشهود بود ($p\leq۰/۰۵$). اما تیمار T_1 برتری امتیازات حسی خود را در طی بازه زمانی ۹۰ روز حفظ کرده و نهایتاً در ماه‌های انتهای نگهداری نسبت به تیمار شاهد از برتری بیشتر رنگ ظاهری برخوردار بود. در بین سایر تیمارها نیز به تدریج با افزایش درصد استفاده از این دو ترکیب، مطلوبیت رنگ ظاهری تیمار بعدی نسبت به قبلی با کاهش معنی‌داری مواجه بوده و به عبارت دیگر از نظر ارزیاب‌ها، میزان رنگ ظاهری سس مایونز با افت معنی‌داری با افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و پودر مغز دانه خربزه مواجه شد. با توجه به امتیازات حسی تیمارهای سس مایونز مشاهده شد که امتیازات قوام تیمارهای سس مایونز به‌طور معنی‌داری با افزایش میزان استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه کاهش معنی‌داری یافت ($p\leq۰/۰۵$). به‌طوری‌که بالاترین میزان امتیازات قوام به تیمار شاهد و کمترین آن به تیمار سس مایونز دارای بالاترین میزان پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه تعلق داشت ($p\leq۰/۰۵$). در طی زمان نگهداری میزان شاخص قوام تیمارهای سس مایونز کاهش معنی‌داری یافت ($p\leq۰/۰۵$). به‌طوری‌که بالاترین میزان امتیازات قوام در روز تولید و کمترین آن در روز نود نگهداری در کلیه تیمارها مشاهده شد ($p\leq۰/۰۵$). تیمار T_1 در روز تولید دارای امتیازات مساوی با تیمار شاهد بوده و در طی نود روز دوره نگهداری نیز برتری خود را نسبت به سایر تیمارهای سس مایونز حفظ نمود ($p\leq۰/۰۵$). همچنین تیمار شاهد نیز در ماه‌های انتهایی نگهداری با کاهش معنی‌داری در میزان قوام خود مواجه شد و امتیازات آن با افت معنی‌داری مواجه شد ($p\leq۰/۰۵$). بررسی نتایج ارزیابی حسی مالش‌پذیری تیمارهای سس مایونز نشان داد که در روز تولید اختلافات معنی‌داری بین امتیازات حسی مالش‌پذیری تیمارهای سس مایونز وجود داشت ($p\leq۰/۰۵$). تیمار سس مایونز شاهد دارای بالاترین میزان امتیاز مالش‌پذیری بین تیمارهای سس مایونز بوده است ($p\leq۰/۰۵$). تیمار T_1 با کمترین میزان استفاده از پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه اختلافات معنی‌داری از نظر مالش‌پذیری با تیمار شاهد نشان نداد ($p\leq۰/۰۵$). اما میانگین امتیازات بالاتری را در انتهای روز ۹۰ دوره نگهداری نشان داد ($p\leq۰/۰۵$). در سایر تیمارهای T_2 تا T_6 با افزایش پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه میزان امتیازات حسی مالش‌پذیری کاهش امتیازات حسی معنی‌داری داشت ($p\leq۰/۰۵$). امتیازات حسی مالش کلیه تیمارهای سس مایونز به‌طور معنی‌داری در طی دوره ۹۰ روز کاهش یافته که حاکی از کاهش میزان مالش‌پذیری تیمارهای سس مایونز با گذشت زمان می‌باشد ($p\leq۰/۰۵$). با توجه به نتایج ارزیابی پذیرش کلی (شکل ۴) مشاهده شد که اختلافات معنی‌داری بین میزان پذیرش کلی بین تیمارهای سس مایونز در روز تولید و تا انتهای مدت زمان نگهداری وجود داشت ($p\leq۰/۰۵$). با افزایش مدت زمان نگهداری میزان امتیازات پذیرش کلی تیمارهای سس مایونز کاهش معنی‌داری را تجربه کرد اما در انتهای روز ۹۰ نگهداری برتری تیمارها به‌ترتیب تیمار سس مایونز دارای حداقل میزان پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه (تیمار T_1) بود ($p\leq۰/۰۵$). کمترین میزان پذیرش کلی نیز در بین تیمارهای سس مایونز از روز تولید تا انتهای مدت زمان ۹۰ روز به تیمار T_6 تعلق داشت ($p\leq۰/۰۵$). سایر

تیمارهای T_2 تا T_5 نیز بین تیمار سس مایونز شاهد و تیمار T6 قرار داشتند ($p\leq$۰/۰۵).

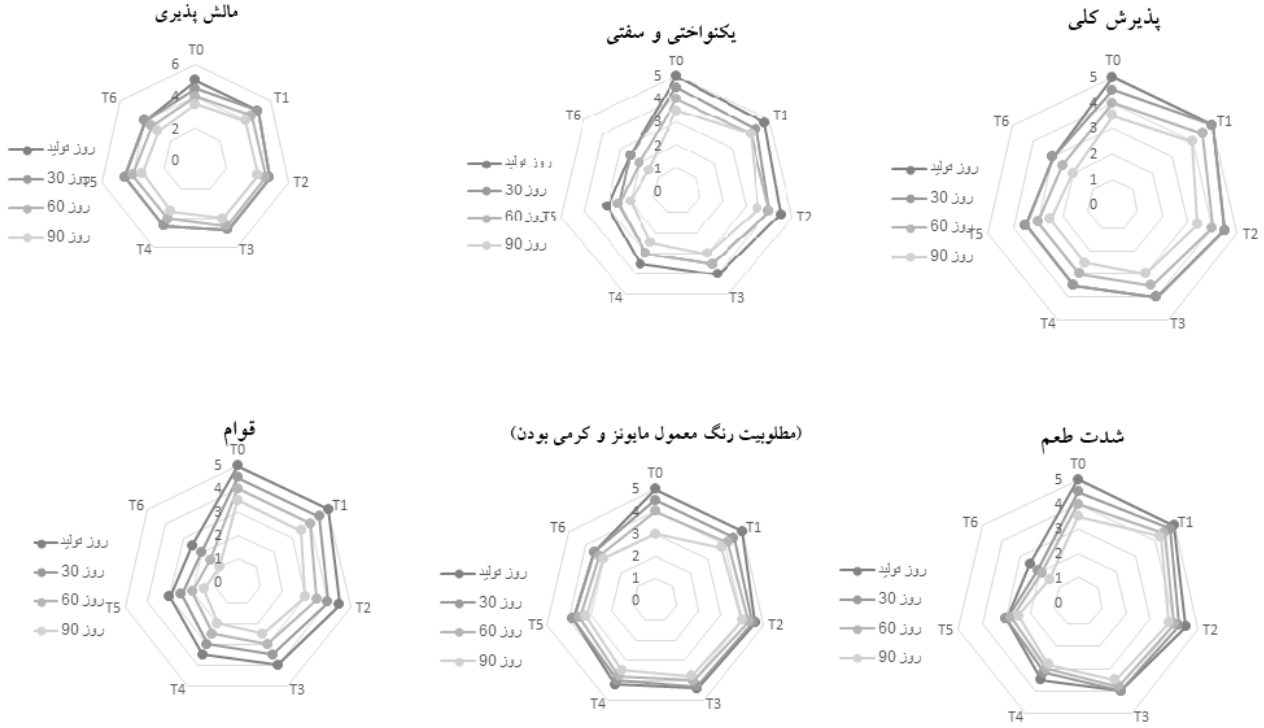
جدول ۳- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی تیمارهای سس مایونز

Table 3- Some physical and chemical characteristics of mayonnaise treatments

Particle size اندازه ذرات	pH	Red قرمزی(a*)	Jaundice زردی(b*)	Lighting روشنایی(L*)	Moisture رطوبت (٪)	Storage time زمان نگهداری	Treatment تیمار
6.49± 0.02 a	3.9± 0.02 b	1.4± 0.02 a	12± 0.15 a	89± 0.01 a	19.86	**0**	**T**
6.54± 0.02 a	3.86± 0.02 b	1.3± 0.03 ab	12± 0.34 a	88± 0.02 ab	19.33	**30**	
6.65± 0.02 ab	3.73± 0.03 b	1.2± 0.01 ab	12± 0.52 a	86± 0.03 b	18	**60**	
7.1± 0.02 b	3.65± 0.04 ab	1.2± 0.02 b	12± 0.65 a	84± 0.01 Bc	17	**90**	
6.92± 0.02 a	3.94± 0.04 b	1.4± 0.02 a	11± 0.07 ab	88± 0.02 ab	19.22	**0**	**T1**
7.32± 0.02 bc	3.91± 0.02 b	1.4± 0.03 a	11± 0.89 b	86± 0.01 b	19	**30**	
7.56± 0.00 c	3.89± 0.01 c	1.25± 0.01 ab	11± 0.32 b	84± 0.02 bc	17.4	**60**	
8.22± 0.02 d	3.65± 0.04 b	1.2± 0.02 b	11± 0.45 b	81± 0.01 c	16.56	**90**	
7.89± 0.03 c	3.89± 0.01 c	1.33± 0.02 a	11± 0.043 a	86± 0.02 b	18.87	**0**	**T2**
7.98± 0.05 c	3.94± 0.04 bc	1.23± 0.03 ab	11± 0.32 a	84± 0.03 bc	18.3	**30**	
8.32± 0.01 d	3.82± 0.01 c	1.11± 0.02 ab	11± 0.01 a	82± 0.02 bc	17	**60**	
8.67± 0.02 de	3.65± 0.04 c	1.09± 0.02 b	10± 0.57 b	79± 0.03 cd	16.23	**90**	
7.89± 0.02 e	4.2± 0.02 a	1.21± 0.03 ab	10± 0.88 b	83± 0.02 bc	18.2	**0**	**T3**
7.98± 0.03 ef	3.99± 0.02 b	1.21± 0.04 ab	10± 0.23 b	81± 0.03 c	17.9	**30**	
8.87± 0.04 f	3.87± 0.05 bc	1.17± 0.05 ab	9± 0.76 c	79± 0.04 cd	17	**60**	
8.67± 0.02 f	3.67± 0.01 c	1.05± 0.02 b	9± 0.56 c	76± 0.03 d	16.23	**90**	
8.3± 0.01 ef	4.33± 0.02 a	1.15± 0.02 a	10± 0.33 b	80± 0.02 c	17.33	**0**	**T4**
8.91± 0.02 f	4.28± 0.02 ab	1.15± 0.03 ab	10± 0.00 b	76± 0.03 d	17	**30**	
8.93± 0.02 ef	4.11± 0.03 ab	1.0± 0.01 ab	9± 0.33 c	73± 0.02 de	16.66	**60**	
9.3± 0.04 e	4.00± 0.03 a	0.9± 0.05 bc	9± 0.00 c	71± 0.02 c	16	**90**	
8.91± 0.02 f	4.42± 0.02 a	1.09± 0.02 a	10± 0.56 a	78± 0.01 c	17	**0**	**T5**
9.1± 0.03 ef	4.31± 0.01 ab	1.3± 0.03 ab	10± 0.34 a	75± 0.02 c	16.4	**30**	
9.87± 0.01 e	4.25± 0.04 ab	0.89± 0.01 ab	9± 0.02 c	72± 0.02 c	16	**60**	
10.22± 0.05 f	4.14± 0.02 ab	0.81± 0.02 b	9± 0.21 c	69± 0.01 c	15.52	**90**	
9.32± 0.02 e	4.56± 0.02 a	1.00± 0.02 b	9± 0.77 c	75± 0.02 c	16.34	**0**	**T6**
9.45± 0.04 e	4.44± 0.02 a	1.00± 0.03 b	9± 0.27 c	72± 0.03 c	16	**30**	
9.9± 0.03 e	4.34± 0.03 ab	0.80± 0.00 c	8± 0.66 d	69± 0.02 c	15.54	**60**	
10.48± 0.01 f	4.39± 0.04 ab	0.65± 0.00 b	8± 0.15 d	67± 0.02 c	15	**90**	

یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار در سس مایونز، میزان سفتی بافت آن بوده که این عامل در پذیرش و جلب رضایت مصرف کنندگان بسیار مؤثر است. بررسی نتایج ارزیابی سفتی نشان داد که استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه به‌طور معنی‌داری میزان سفتی تیمارهای سس مایونز را به‌طور معنی‌داری افزایش داد که میزان این افزایش در تیمارهای سس مایونز دارای مقادیر T_5 و T_6 پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه به میزان بالاتری سفتی را افزایش داد. به‌نظر می‌رسد که به دلیل افزایش بیش از حد استاندارد محتوای پروتئینی، حضور پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه و فیبر و یا موسیلاژ بیش از انتظار در فرمولاسیون بوده که مواد روی پوسته در حضور آب موجود در فرمولاسیون ایجاد ساختارهای کلوخه‌ای نموده‌اند و سبب سفتی بیش از اندازه و نامطلوب بافت سس مایونز شده است. از طرفی نیز کاهش خود روغن فرمولاسیون به‌طور فراتر از حد در محصول، بر افزایش سفتی بافت دامن زده است. میزان انسجام رابطه معکوس با میزان سفتی دارد. با توجه به این‌که مایونز ماده‌ای نیمه جامد است، انتظار می‌رود میزان سفتی و انسجام آن در حد متعادل باشد. Arabshahi و همکاران (۱۳۹۳) نیز در بررسی تأثیر استفاده از موسیلاژ دانه ریحان به‌عنوان جایگزین چربی بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، رئولوژیکی، بافتی و حسی سس مایونز کم‌چرب نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آن‌ها دریافتند که استفاده از موسیلاژ دانه ریحان نیز میزان سفتی را افزایش

و میزان انسجام سس مایونز را کاهش داد. با افزایش میزان پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه به دلیل افزایش بیش از حد ویسکوزیته و افزایش درصد ماده خشک سس مایونز و افزایش میزان پیوندهای درون مولکولی و ژله‌ای شدن آن ساختارهای ناهمگنی از پروتئین‌های سس مایونز و پوره تخم کدو حلوایی تشکیل می‌گردد که باعث کاهش پایداری امولسیون سس مایونز می‌گردد در این راستا نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت. Niknia و همکاران (۱۳۸۹) نیز با بررسی تأثیر کاربرد صمغ دانه ریحان و دانه مرو بر ویژگی‌های حسی و پایداری سس مایونز نیز به نتایج مشابهی دست یافتند که با نتایج تحقیق حاضر نیز در توافق بود.



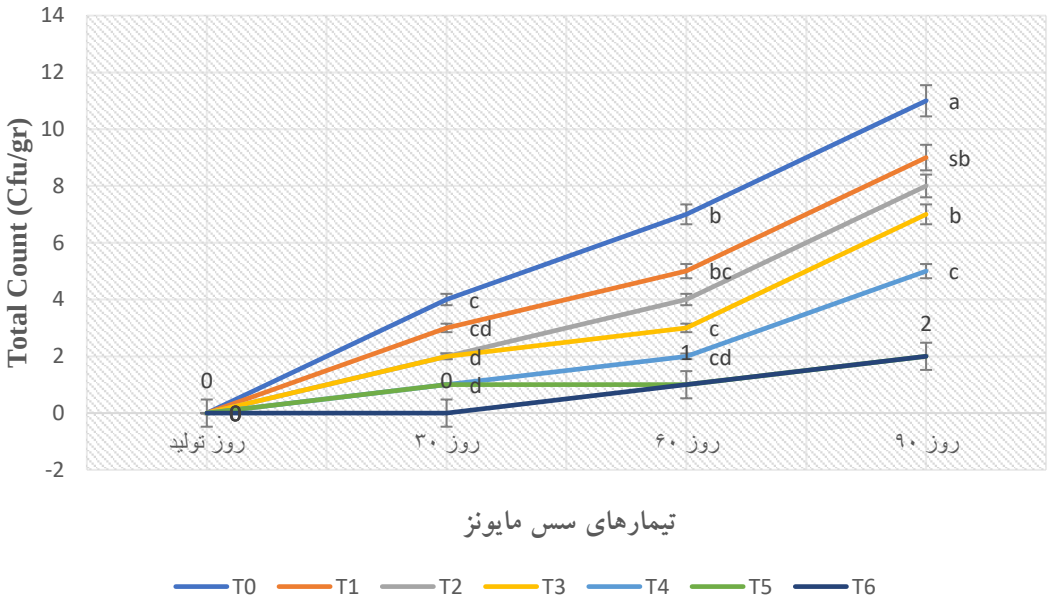
شکل ٤- مقایسه میانگین شاخص ارزیابی حسی تیمارهای سس مایونز در طی ۹۰ روز نگهداری

Fig. 4. Comparison of the average sensory evaluation index of mayonnaise treatments during 90 days of storage.

تغییرات جمعیت میکروبی

با توجه به شکل ۵، در این تحقیق مشاهده شد که استفاده از پودر پوست پسته و آرد مغز دانه خربزه به طور معنی‌داری میزان جمعیت میکروبی تیمارهای سس مایونز را کاهش می‌دهد ($p\leq ۰/۰۵$). به‌طور کلی رشد و بقاء باکتری‌ها در مواد غذایی به عوامل غذایی به عوامل متعدد بیرونی مانند فلور باکتریایی، درجه حرارت، افزودنی‌هایی که در پروسه تهیه مواد غذایی استفاده می‌شود و نیز عوامل داخلی ترکیبات ماده غذایی، بستگی دارد. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معمولاً ترکیبات فنولیک گیاهی هستند که از منابع مختلف گیاهی به‌دست می‌آیند. ترکیبات فنولیک معمولاً چندکاره هستند و می‌توانند به‌عنوان عوامل کاهنده، (رادیکال‌های آزاد)، کی‌لیت کننده فلزات و فرونشاننده اکسیژن یکتایی عمل کنند. تحقیقات نشان داده که غذاهای غنی از ترکیبات فنولیک با یکسری از خصوصیات فیزیولوژیکی همانند آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدجهش‌زایی، بازدارنده اکسیداسیون لیپوپروتئین و تجمع پلاکت‌ها، فعالیت ضدالتهابی و غیره را دارا می‌باشند. گلی و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که پوست سبز پسته حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنولیک می‌باشد که مقدار آن در مقایسه با منابع دیگر قابل توجه می‌باشد. به‌طور کلی باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت‌ها نسبت به ترکیبات فنولیک مقاوم‌تر هستند که این تفاوت شاید به دلیل تفاوت در ساختمان دیواره سلولی آن‌ها باشد. تحقیقات متعددی روی فعالیت ضدمیکروبی عصاره گیاهان مختلف انجام شده است. از جمله این تحقیقات می‌توان به تحقیق Oliverilab و همکاران (۲۰۰۸) روی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی پوست گردو اشاره کرد. در این تحقیق اثر ضدمیکروبی عصاره پوست گردو روی باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت، مخمر و کپک بررسی شد. نتایج نشان داد که ترکیبات فنولیک تنها روی باکتری‌های گرم منفی از جمله *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* اثر ضدمیکروبی دارند، در تحقیق دیگر توسط Oliverilab و همکاران (۲۰۰۸) که روی

خاصیت ضدمیکروبی عصاره سه واریته فندق انجام شد نتیجه مشابهی به‌دست آمد. نتایج این تحقیق نیز یافته‌های این محققین را تائید می‌کند و نشان می‌دهد که ترکیبات فنولیک اثر ضدمیکروبی بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی و قارچ‌ها دارند. مقالات زیادی در مورد فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات فنولیک گزارش شده است. با وجود این، سازوکار این ترکیبات به روشنی مشخص نشده است. Prindle و Wright (۲۰۱۳) گزارش کرده‌اند که اثر ترکیبات فنولیک وابسته به غلظت می‌باشد. در غلظت‌های پایین، ترکیبات فنولیک بر فعالیت آنزیم‌ها به‌ویژه آنزیم‌هایی که در ارتباط با تولید انرژی هستند اثر می‌گذارند، در صورتی‌که در غلظت‌های بالاتر، ترکیبات فنولیک باعث غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها می‌شوند. اثر ترکیبات فنولیک بر رشد میکروب‌ها و تولید سم می‌تواند در نتیجه قابلیت ترکیبات فنولیک در تغییرپذیری دیواره سلولی و خروج ماکرومولکول‌ها از درون سلول نیز باشد. همچنین این ترکیبات می‌توانند با پروتئین‌های غشاء واکنش داده و باعث تغییر شکل این پروتئین‌ها و به تبع آن تغییر در عملکرد آن‌ها شوند. Rico Muñoz و همکاران (۲۰۱۱) پس از این که نشان دادند که ترکیبات فنولیک مختلف اثرات مختلفی روی غشاء *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند، نتیجه گرفتند که ترکیبات فنولیک احتمالاً یک سازوکار مشترک ندارند و ممکن است که هدف‌های مختلفی در ارتباط با اثر ضدمیکروبی آن‌ها وجود داشته باشد. آرد دانه خربزه با دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به مهار اکسیداسیون و همچنین اکسیداسیون لیپیدی توسط فلور میکروبی کمک کرده و با کاهش میزان شاخص فعالیت آبی در تیمارهای سس مایونز میزان شاخص رشد میکروبی را کاهش داده و نهایتاً باعث کاهش رشد کپک و مخمر در تیمارهای سس مایونز به همراه پودر پوست پسته شود.



شکل ۵- مقایسه میانگین شاخص جمعیت میکروبی تیمارهای سس مایونز در طی ۹۰ روز نگهداری

Fig. 5. Comparison of the average microbial population index of mayonnaise treatments during 90 days of storage.

نتیجه‌گیری

خطر کاهش مواد غذایی موجود در طبیعت و افزایش روزافزون جمعیت و ترس از عدم جایگزینی مواد مورد استفاده به‌خصوص غذا برای انسان، توجه بسیاری از محققین کشورهای جهان را به استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی به‌خصوص در زمینه صنایع مواد غذایی را به خود معطوف کرده است. با زیانی مواد زاید صنایع مواد غذایی و کشاورزی می‌تواند در بسیاری از موارد، راه‌گشای حل مشکلات کمبود مواد غذایی در طبیعت باشد. در این تحقیق از پودر پوست سبز پسته و آرد دانه خربزه به‌منظور تهیه سس مایونز فراسودمند رژیمی و همچنین استفاده از ضایعات پوست پسته که درصد بالایی می‌باشد، استفاده شد. تاکنون در فرمولاسیون هیچ نوع سسی از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه استفاده نشده است. نتایج تحقیق نشان داد که استفاده از پودر پوست پسته و آرد دانه خربزه به میزان ۰/۱ درصد و ۶ درصد می‌تواند به عنوان فرمولاسیون بهینه مناسب جهت تولید سس مایونز فراسودمند در این تحقیق پیشنهاد شود. مقادیر بالاتر از تیمار بهینه به دلیل کاهش پایداری و افزایش جمعیت میکروبی و همچنین کاهش امتیازات حسی سس مایونز توسط ارزیاب‌ها و همچنین مغایرت پارامترهای حاصله با استاندارد ملی سس مایونز نمی‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. نهایتاً با

نسبت ذیل می‌توان از آن در فرمولاسیون سس مایونز استفاده کرد. به طور کلی با توجه به تغییرات خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و حسی در مقادیر بالای استفاده در مقایسه با استاندارد ملی تا مقادیر میران ۰/۱ درصد و ۶ درصد می‌تواند به‌عنوان تیمار بهینه مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Abedini, M, Varidi, M. J, Shahidi, F, Marashi, S. H. (2008). The effect of melon seed flour as a fat substitute on chemical and sensory properties of meat products, *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 6(4); 58-51.
2. Adeli Milani, M, Mizani, M, Ghavami, M. (2007). Effect of yellow mustard powder on viscosity, suspension stability, tangy and sensory properties of mayonnaise. *Iranian Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 5(3); 35-43.
3. Agullo, E., Rodriguez, M. S., Ramos, V .Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food .*Macromolal Bioscience*, 3(10); 521-530. https://doi.org/10.1002/mabi.200300010
4. Altunkaya. A., Hedegaard. R. V., b. Harholt. J., Brimer. L., Gokmen, V. and HSkibsted H. L. (2013).Oxidative stability and chemical safety of mayonnaise enriched with grape seed extract, *Food & Function*; 4, 1647–1653.
5. Amiri Aghdaei, S. S, Rezaei, R., Alami. M. (2011). Feasibility of using tragacanth gum and maltodextrin as a fat substitute in mayonnaise, *Electronic Journal of Food Processing and Storage*, 2(3); 1-18.
6. Aslanzadeh, M, Mizani, M, Gerami, A, Alimi, M. (2012). Evaluation of the performance of dietary fiber produced from wheat bran as a fat substitute in mayonnaise, *Iranian Journal of Food science and Nutrition*, 11, 21-31.
7. Darvishian, M. (2002). Cultivation and production of pistachios "Translated by Ayandegan Ayandegan Cultural Institute 212 p.
8. Haghayegh, G. H. and Zavehzad, N. (2016). The use of melon seed flour as a fat mimic in the production of low-fat cakes and the study of quantitative and qualitative characteristics of the final product, *Quarterly Journal of Food Science and Technology*, 35(13); 23-15.
9. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2002) Microbiology of mayonnaise sauce and salad sauce Specifications and test methods. ISIRI no 2965. 2nd revision, Karaj: ISIRI; [in Persian].
10. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2015). National Standard 2454. Mayonnaise and salad dressings- Features and test methods
11. Ladjane, M., Melo, S., Narain, N., Bora, P. B. (2000). Characterization of some nutritional constituents of melon (Cucumismelo hybrid AF- 522) seeds. *Original Research Article Food Chemistry*, 68(4): 411-414. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00209-5
12. Luisa Garcı´a, M. M., Abozeid, M., Manal, F .Salama., and Moawad, R. K. (2005) .Utilization of fat replacer in the production of reduced cakes and cookies. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(12)2833-2840.
13. Malakotian, M., Yaghmaeian K. (2012). Feasibility study of compost production using pistachio skin and a mixture of pistachio skin and poultry waste. Yazd School of Health, 41; 24-35.
14. Matsakidou, E., O`Brien, C. M., Scannell, A. G. M., and Arendt, E. K. 2010.Use of response surface methodology to reduce functional short dough biscuits. *Journal of Food Engineering*, 56: 269-271. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00265-0
15. Mentes, O, Bakkalbasi, E. Ercan, R. (2008). Effect of the use of ground flaxseed on quality and chemical composition of bread. *Food Science and Technology*; 14:299. https://doi.org/10.1177/1082013208097192
16. Mesbahi, Gh., Abbasi, A., Jalalian, J., Farahnaki, A. (2009).Adding tomato peel and seeds to ketchup in order to improve its nutritional value and rheological characteristics, *Agricultural science and technology and natural resources*, 48., 69-82.
17. Ministry of Agriculture Statistics. Amarname. (2010). Agricultural products notes.
18. Moeini Feizabadi, A, Karagian H, Mahdian A. (2012). Rheological and contextual characteristics of mayonnaise containing cress gum, *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 3(5);64-55 [In persian].
19. Mohammadi Moghadam, T, Razavi, M, Malekzadeghan, F, Shaker. (2008). Investigation of physicochemical and sensory properties of green pistachio skin marmalade, *Food science and technology*;1-10.
20. Najafi, A. and Sharif, A. (2007). Khaghani melon seeds as a source of oil. Proceedings of the Regional Conference on Food. Islamic Azad University. Quchan branch. Quchan. Iran. 61-71. (in Persian)
21. Nasrabadi, M.bA, Admiral, Th. 2018. The effect of melon seed flour on physicochemical, pharynographic and stale properties of Sangak bread, 3rd International Conference on Architecture, Civil Engineering, Agriculture and Environment, Sofia-Bulgaria.
22. Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L. and Pereira. J. A. (2009). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80, 393–397. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.017

23. Oliveirab, I., Sousa, A., Morais, J. S., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L. and Pereira, J. A. (2008). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1801–1807. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.002
24. Puligundla, P, Cho Y. H, Lee Y. T. (2015). Physicochemical and sensory properties of reduced-fat mayonnaise formulations prepared with rice starch and starch-gum mixtures, Emirates *Journal of Food and Agriculture*. 27(6): 463-468.
25. Rahmati, K, Mazaheri Tehrani. M, Daneshvar. K, Kouchaki. A. (2012). The effect of peri-gelatinized corn starch, xanthan and guar as fat substitutes on the physical and sensory properties of mayonnaise with reduced fat and eggs containing soy milk, Thesis. Government - Ministry of Science, Research, and Technology - Ferdowsi University of Mashhad - Faculty of Agriculture and Natural Resources, M.Sc.
26. Rodrigues, L., Fortuna, T. & Kosla, A. (2003). Sensory and rheological properties of polish commercial mayonnaise. Nahrung/Food, 47, 4, 232-235. https://doi.org/10.1002/food.200390054
27. Shahidi, F., Kocheki, A. and Baghaie, H. (2006). Evaluation of chemical composition and physical properties of Iranian Watermelon, Cucurbit, Cantaloupe and Muskmelon seeds and determination of their seeds oil. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 20(5): 411-421.
28. Shirmohammadi, M, Zarrin Ghalami. S. (2015). The effect of extraction and sonication on extraction efficiency and bioactive compounds of ethanolic extract of linseed powder. Food Science and Technology of Iran. 1396 [cited 2021June18]; 14(67):11-18.
29. Sorensen, AD., Nielsen, N. S., Jacobsen, Ch. (2010). Oxidative stability of fish oil-enriched mayonnaise-based salads .*Lipid Science Technology*; 112: 476–487. https://doi.org/10.1002/ejlt.200900180
30. Tseng, A., Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fiber for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing, *Food Chemistry*, 138: 356– 365. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.148
31. Wien, S. A. (2004). Effect of Melon seed meal addition on some quality characteristics of chicken sausage. *Science of Food Agriculture*, 84:423- 426. https://doi.org/10.1002/jsfa.1661
32. Wyllie, S. G., Leach, D. N., Wang, Y. M., and Shewfelt, R. L. (1995). Key aroma compounds in melons-their development and cultivar dependence. Laser Control and Manipulation of Molecules. 596: 248–257.
33. Zweigle, C. A .(2010). Pistachio by-products as substrate for shiitake mushrooms. MSc thesis, Jordan College of Agricultural Sciences and Technology California State University

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 514- 526

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۲۶-۵۱۴

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

Full Research Paper

Production of nanoemulsion based on sweet almond and sesame oils using ultrasound and evaluation its properties

Masoumeh Heydari Gharehcheshmeh[1], Akram Arianfar*[1], Elham Mahdian[1], Sara Naji-Tabasi[2]

Received: 2021.02.23
Revised: 2021.10.18
Accepted: 2021.11.16
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Heydari Gharehcheshmeh, M., Arianfar, A., Mahdian, E., Naji-Tabasi, S. (2022). Production of nanoemulsion based on sweet almond and sesame oils using ultrasound and evaluation its properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 514-526.

Abstract

Introduction: Sesame oil and sweet almond oil are rich in unsaturated fatty acids and antioxidant components, providing nutritional and functional properties including improvement of the gastrointestinal system, decrease in blood cholesterol level, eventually leading to a decrease in the risk of cardiovascular disease. The present study examined the possibility of the production of emulsion based on sesame and sweet almond oils and the effect of preparation on its stability.

Material and methods: Sesame oil and sweet almond oil with tween 80 and span 80 as emulsifiers were used in emulsion production. In order to prepare the nanoemulsions, the water and oil phases were prepared separately by the ultrasonic homogenizer. Ultrasonic waves were applied for homogenization and the effect of Ultrasonic time (5, and 10 min), oil content (2, and 4%), and emulsifier concentration (0.25, 0.5%) on particle size, particle distribution index (PDI), turbidity loss rate, emulsion stability and zeta potential of nanoemulsions were studied.

Results and discussion: Ultrasonic time had a reverse effect on particle size, particle distribution index (PDI) and turbidity loss rate and a direct effect on emulsion stability. The particle size and turbidity loss rate of prepared emulsions had a direct relation with oil concentration and a negative effect on emulsion stability. Emulsifier concentration had a positive effect on emulsion stability, a negative effect on emulsion stability, and had no significant effect on turbidity loss rate. According to the results of the effect of type and concentration of oil on particle size distribution, turbidity reduction rate and stability of nanoemulsions in all cases, samples containing sesame oil with a concentration of 2% compared to sweet almond oil, had better results, the presence of this oil led to the formation of nanoemulsions with smaller particles and greater stability. The produced nanoemulsions had a particle size between 200-320 nm, a stability of 91-98/7% and a turbidity reduction rate of 0.0010-0.0027. Also, the highest stability and zeta potential were reported 98.7 % and -33mV respectively, which belonged to sample k4. Therefore, this sample was selected as the optimal sample.

The results showed that the particle size, mean particle diameter, particle dispersion and turbidity reduction rate showed a significant difference between the samples, so that the lowest and highest were related to K_4 sample (2% sesame oil, homogenization time 10 minutes and Emulsifier concentration ratio 0.5%) and sample B_5 (almond oil 4%, homogenization time 5 minutes and emulsifier concentration ratio 0.5%) ($p < 0.05$). The results also showed that the highest level of stability and zeta potential was related to K_4 sample. Thus, the best nanoemulsion, K4 sample was introduced.

1. Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2. Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), POBox: 91895-157.356, Mashhad, Iran.
(*Corresponding Author Email: a_aria_1443@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69078.1020

Keywords: Nanoemulsion, Particle size, Stability, sweet almond oil, sesame oil.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 514- 526

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۲۶-۵۱۴

مقاله علمی-پژوهشی

تولید نانوامولسیون بر پایه روغن بادام شیرین و کنجد با استفاده از امواج فراصوت و ارزیابی ویژگی‌های آن

معصومه حیدری قره‌چشمه[۱]- اکرم آریان‌فر[۱*]- الهام مهدیان[۱]- سارا ناجی طبسی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۷/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵

چکیده

امروزه استفاده از نانوامولسیون‌ها در صنایع غذایی و دارویی به علت خواص عملکردی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصر به فردی که دارند، به‌طور فزاینده‌ای رو به افزایش است. کارایی بالا در محصورسازی ترکیبات، کدورت پایین، قابلیت دسترسی بالا و ثبات فیزیکی بالا از جمله این ویژگی‌ها هستند. در این پژوهش، از روغن بادام شیرین و کنجد به همراه توئین ۸۰ و اسپن ۸۰ (به‌عنوان امولسیفایر) در تولید نانوامولسیون استفاده شد. به‌منظور همگن‌سازی ذرات امولسیون از امواج فراصوت استفاده گردید و تاثیر شرایط مختلف فرآیند شامل غلظت روغن (۲ و ۴ درصد)، زمان همگن‌سازی (۵ و ۱۰ دقیقه) و غلظت امولسیفایر (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد) بر متغیرهای وابسته شامل قطر ذرات، شاخص پراکنش ذرات، نرخ کاهش کدورت، پایداری و پتاسیل زتا نانوامولسیون‌ها مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به لزوم تهیه فاز آبی و فاز روغنی به‌طور جداگانه، منظور ازغلظت امولسیفایر، نسبت غلظت مونواولئات سوربیتان(اسپن ۸۰) به پلی‌سوربات (توویین ۸۰) در فرمولاسیون تهیه نانوامولسیون می‌باشد. طبق نتایج با استفاده از پارامترهای فوق قادر به تولید ذراتی در ابعاد نانو و با پایداری فیزیکی مناسبی خواهیم بود. تشکیل، پایداری و خصوصیات نانوامولسیون‌ها اغلب به خصوصیات فیزیکوشیمایی فاز روغن (قطبیت، حلالیت در آب، کشش سطحی، اندیس رفراکتیو، ویسکوزیته، رفتار فازی و پایداری) بستگی دارد. لذا طبق نتایج به‌دست آمده از تاثیر نوع و غلظت روغن بر توزیع اندازه ذرات، نرخ کاهش کدورت و میزان پایداری نانوامولسیون‌ها، در تمامی موارد نانوامولسیون‌های حاوی روغن کنجد با غلظت ۲ درصد نسبت به روغن بادام شیرین، از نتایج بهتر برخوردار بودند و حضور این روغن منجر به شکل‌گیری نانوامولسیون با ذرات ریزتر و پایداری بیشتری شد. نمونه‌های تولیدی دارای اندازه ذرات بین ۳۲۰- ۲۰۰ نانومتر، پایداری ٪۹۸/۷ -۹۱ و نرخ کاهش کدورت ۰/۰۰۲۷ -۰/۰۰۱۰بودند. نتایج نشان داد، میزان اندازه ذرات، میانگین قطر ذرات و نرخ کاهش کدورت میان نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری داشته، بطوریکه کمترین و بیشترین به‌ترتیب مربوط به نمونه K4 (روغن کنجد ۲ درصد، زمان همگن‌سازی ۱۰ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) و نمونه B5 (روغن بادام ۴ درصد، زمان همگن‌سازی ۵ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) بود. بیشترین میزان پایداری و پتاسیل زتا به‌ترتیب ٪۹۸/۵ و ۳۳- میلی‌ولت گزارش شد که مربوط به نمونه K4 بوده و طی زمان همگن‌سازی (زمان فراصوت) ۱۰ دقیقه و با افزودن روغن کنجد، تهیه شده بود. علاوه بر پایداری بالاتر این تیمار، از آنجاییکه در بین سایر تیمارها از کوچکترین ذرات (۲۰۰ نانومتر) برخوردار بود، فرمولاسیون نانوامولسیون k4، به‌عنوان فرمولاسیون بهینه برای انجام سایر آزمایش‌ها مانند پتانسیل زتا، کدورت، پایداری، توزیع اندازه ذرات و حصول اندازه قطره‌ها درمقیاس نانو انتخاب شد.

واژه‌های کلیدی: نانوامولسیون، قطر ذرات، پایداری، روغن بادام شیرین، روغن کنجد.

مقدمه

امولسیون‌ها، تعلیق‌های کلوئیدی ناهمگنی هستند که از اختلاط دو مایع غیرقابل امتزاج تشکیل می‌شوند. این سامانه‌ها از نظر ترمودینامیکی ناپایدار بوده و ممکن است به تدریج پایداری خود را از دست بدهند (Deman, 1990). در سامانه‌های امولسیونی، ویژگی‌هایی مانند پایداری، رئولوژی، ظاهر، رنگ و بافت بستگی به اندازه قطرات و توزیع اندازه قطرات آنها دارد (Tadros et al., 2004). به‌طورکلی، اندازه قطرات امولسیون‌ها به عوامل متعددی وابسته است که مهم‌ترین آن‌ها، روش و شرایط تولید و نیز نوع و غلظت ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها می‌باشد (Gutierrez et al., 2008). مکانیسم‌های فیزیکوشیمیایی

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.
۲- گروه نانو فناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

* - نویسنده مسئول: Email: a_aria_1443@yahoo.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69078.1020

متعددی از جمله خامه‌ای شدن[3]، انعقاد، لخته شدن[4] و تورم استوالد[5] سبب بی‌ثباتی امولسیون می‌شوند (Coupland et al., 2001). برای حفظ پایداری امولسیون از یک سورفکتانت یا امولسیفایر استفاده می شود که با جذب در سطح قطرات غشای محافظ را ایجاد و با کاهش کشش بین سطحی از تجمع و بهم پیوستن ذرات فاز پراکنده و در نهایت جدایش کامل دو فاز، جلوگیری می‌کند. افزودن امولسیفایر به مخلوط آب و روغن سبب کاهش کشش سطحی و تثبیت امولسیون می‌گردد. ترکیبات گوناگونی به‌عنوان امولسیفایر شناخته شده‌اند. پروتئین‌ها، دسته‌ای از امولسیفایرها هستند که قادرند امولسیون‌هایی با ذرات کوچک ایجاد کنند اما اندازه ذرات امولسیون در طول زمان افزایش یافته و سبب ناپایداری امولسیون می‌گردد. متوسط قطر ذرات امولسیون‌های پایدار شده توسط پلی‌ساکاریدها، بالا است اما این ذرات دارای مقاومت بالا در برابر استرس‌های محیطی و افزایش اندازه ذرات هستند (Harnsilawat et al., 2006). بنابراین با کاربرد گروه‌های امولسیفایری مذکور قادر نیستیم امولسیون‌هایی با قطر ذرات کوچک و پایداری بالا در طول زمان تولید کنیم (Qian et al., 2011). پلی سوربات‌ها و استرهای سوربیتان گروهی از ترکیبات فعال سطحی غیریونی مورد استفاده در صنایع غذایی و دارویی هستند. این ترکیبات قادرند امولسیون‌هایی با اندازه ذرات کوچک و پایداری بالا در هنگام نگهداری تولید کنند این امولسیفایرها با توجه به در دسترس بودن، ایمنی و هزینه قابل قبول، به‌طور گسترده در صنایع غذایی استفاد می‌شوند (Leong et al., 2009). امولسیون‌ها را از روی اندازه قطرات امولسیون، به میکرو (۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر)، نانو (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر) و ماکرو (۰/۵ تا ۱۰۰ میکرومتر) تقسیم می‌کنند (Gutierrez et al., 2008).

نانوامولسیون‌ها، امولسیون‌های حقیقی با قطراتی با اندازه بی نهایت کوچک هستند که از این لحاظ تشابه زیادی با میکروامولسیون‌ها دارند. اما برخلاف میکروامولسیون‌ها، که آنها هم شفاف یا نیمه‌شفاف و به‌صورت ترمودینامیکی پایدار هستند، نانوامولسیون‌ها فقط به‌صورت سینتیکی پایدارند. به بیان دیگر، میکروامولسیون‌ها سامانه‌های تعادلی هستند، یعنی تعادل ترمودینامیکی دارند، در حالی که نانوامولسیون ها سامانه‌های غیرتعادلی با یک تمایل خودبه‌خودی به جدا شدن به فازهای تشکیل‌دهنده هستند. البته، نانوامولسیون‌ها ممکن است تعادل سینتیکی نسبتا بالایی را حتی برای چندین سال داشته باشند و این طولانی بودن دوره پایداری فیزیکی موجب متمایز شدن آن‌ها شده است (Solans et al., 2005).

اساساً فرایند امولسیون‌سازی شامل دو مرحله است؛ در مرحله نخست، با تغییر شکل و شکستن قطرات، سطح ویژه امولسیون افزایش داده می‌شود اما در مرحله دوم، با استقرار مواد فعال سطحی یا امولسیفایرها در سطح مشترک فازها، علاوه بر پایدارسازی، از به هم‌پیوستن مجدد قطرات تشکیل شده جدید جلوگیری می‌شود. به این ترتیب، معمولاً برای انجام مرحله نخست تجهیزات مختلفی مثل مخلوط‌کن‌های ساده، مخلوط‌کن‌های با سرعت برشی بالا، همگن سازهای با فشار بالا، همگن‌سازهای دارای حرکت گردابی، همگن سازهای فراصوت، و همگن‌سازهای آسیاب کلوئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Silva et al., 2012). بهینه‌سازی ویژگی‌های نانوامولسیون-ها از طریق بهینه کردن متغیرهای مربوط به ترکیبات و نیز متغیرهای مربوط به روش و شرایط تهیه آنها ممکن خواهد بود. اهداف عمده و نهایی در بهینه‌سازی ویژگی‌های نانوامولسیون‌ها اغلب رسیدن به حداقل اندازه قطرات، حداقل بس‌پاشیدگی و حداکثر پایداری است (Tadros et al., 2004). به‌طورکلی، تولید نانوامولسیون‌ها به دو روش ممکن است: امولسیون‌سازی با انرژی پایین (فرایند میکروامولسیون-سازی) و امولسیون‌سازی با انرژی بالا که روش دوم، به دلیل کنترل توزیع اندازه قطرات امولسیون و قابلیت تولید امولسیون‌هایی مناسب و با تنوع زیاد، قابلیت کاربرد صنعتی بیشتری دارد و تهیه نانوامولسیون‌ها به روش امولسیون‌سازی با انرژی بالا با استفاده از تجهیزاتی از جمله آسیاب‌های کلوئیدی، همگن‌سازهای با سرعت یا فشار بالا، و همگن سازهای فراصوت ممکن است. در این میان، همگن‌سازهای فراصوت کارایی بالایی برای کاهش اندازه قطرات و دستیابی به حداقل بس-پاشیدگی و در نتیجه پایداری نانوامولسیون دارند (Silva et al., 2012). امواج فراصوت با شدت بالا از طریق ظهور اثرات مکانیکی پدیده حفره‌زایی، یعنی ایجاد نیروهای برشی شدید و اعمال فشار و دما قادر به ایجاد تغییر در ویژگی‌های مواد تحت فرآیند هستند (Rao et al., 2011; Li and Chiang, 2012).

از جمله مزایای نانوامولسیون‌ها، ریز بودن اندازه قطرات است که در مقایسه با امولسیون‌های معمولی کاربرد بیشتری دارند (Silva et al., 2012). خیلی ریز بودن اندازه قطرات نانوامولسیون‌ها نیز موجب می‌شود در طی نگهداری پدیده‌های خامه‌ای شدن و تشکیل رسوب اتفاق نیفتند، زیرا ریز بودن قطرات مانع به‌هم پیوستگی و فلوکه شدن سطحی می‌گردد. همچنین، به‌واسطه خیلی ریز بودن قطرات، نانوامولسیون‌ها سطح ویژه زیادی دارند و به همین دلیل قابلیت نفوذ خیلی بالایی داشته و این ویژگی آنها را به یک سامانه انتقالی موثر تبدیل کرده است. ضمناً، برخلاف امولسیون‌ها که به غلظت بالایی از

3 Creaming
4 Flocculation
5 Ostwald Ripening

سورفاکتانت نیاز دارند، نانوامولسیون‌ها در حضور غلظت پایین‌تری از این مواد تشکیل می‌شوند.

Qian و همکاران (۲۰۱۱)، گزارش کردند نانوامولسیون‌های روغن ذرت تهیه شده با سورفاکتانت‌های کوچک مولکول در مقایسه با نمونه های تولید شده با پروتئین‌ها، اندازه قطرات کوچکتری داشتند (Qian et al., 2011). اصولاً، شکل‌گیری قطرات نانوامولسیون به‌واسطه برهم‌کنش دو پدیده، یعنی شکستن قطرات و به‌هم پیوستن قطرات تشکیل شده کنترل می‌شود. در این میان، نرخ به‌هم پیوستگی قطرات توسط فعالیت سطحی و غلظت امولسیفایر تعیین می‌شود. از آنجاییکه روغن بادام شیرین شامل درصد بالایی از اسید چرب غیراشباع (اولئیک اسید و لینولئیک اسید) و روغن کنجد حاوی اسید لینولئیک تا حدود ۴۱ درصد و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی همچون توکوفرول و ترکیبات فنلی می باشند، می‌توانند میزان کلسترول و زمینه ابتلا به سرطان را کاهش دهد (Jacobsen, 2010). روغن کنجد در مقایسه با سایر روغن‌های گیاهی، مواد غیرقابل صابونی (حدود ۲ درصد) بیشتری دارد. مواد غیرقابل صابونی شامل استرول‌ها، تری ترپن‌ها و تری ترپن الکل‌ها، توکوفرول ها و لیگنان‌های کنجد می‌باشد. این روغن یکی از منابع غنی استرول‌های گیاهی (فیتواسترول) می‌باشد. مصرف فیتواسترول موجب کاهش کلسترول خون و در نتیجه جلوگیری از حملات قلبی و عروقی می‌شود. با توجه به خصوصیات ذکر شده، در این تحقیق، جهت تهیه نانوامولسیون به کمک امواج فراصوت، از دو نوع روغن کنجد و بادام شیرین به‌صورت جداگانه و در دو غلظت ۲ و۴٪، همراه با اسپن و توین۸۰ (به‌عنوان امولسیفایر) استفاده شد و تاثیر زمان همگن‌سازی (زمان فراصوت)، غلظت امولسیفایر و روغن بر روی قطر ذرات، شاخص پراکنش ذرات، نرخ کاهش کدورت، پایداری و پتاسیل زتا، مورد بررسی گردید.

جدول ۱- تیمارهای مورد بررسی

Table 1- The treatments examined

Sample Code کد نمونه	Oil روغن	Sonication time (min) زمان فراصوت (دقیقه)	Ratio of emulsifier concentration (span to tween) نسبت غلظت امولسیفایر(اسپن به توین)
K_1	Sesame کنجد 2٪	5	0.25
K_2	Sesame کنجد 2٪	10	0.25
K_3	Sesame کنجد 2٪	5	0.5
K_4	Sesame کنجد 2٪	10	0.5
K_5	Sesame کنجد 4٪	5	0.5
K_6	Sesame کنجد 4٪	10	0.5
B_1	Sweet almonds بادام شیرین 2٪	5	0.25
B_2	Sweet almonds بادام شیرین 2٪	10	0.25
B_3	Sweet almonds بادام شیرین 2٪	5	0.5
B_4	Sweet almonds بادام شیرین 2٪	10	0.5
B_5	Sweet almonds بادام شیرین 4٪	5	0.5
B_6	Sweet almonds بادام شیرین 4٪	10	0.5

مواد و روش‌ها

روغن بادام شیرین و روغن کنجد از بازار محلی تهیه شد. پلی‌سوربات ۸۰، مونواولئات سوربیتان (Span 80) و سایر مواد آزمایشگاهی مورد نیاز جهت انجام آزمون‌ها، از شرکت مرک آلمان خریداری گردید.

روش تهیه نانو امولسیون روغن بادام شیرین و روغن کنجد در آب

به‌منظور تهیه نانو امولسیون‌مورد نظر در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد، طی دو زمان فراصوت ۵ و ۱۰ دقیقه، توسط دو روغن کنجد و بادام شیرین، در دو غلظت ۲و ۴ درصد، فاز آبی و فاز روغنی هر کدام به‌صورت جداگانه تهیه شدند. جهت آماده‌سازی نانوامولسیون بر پایه روغن کنجد، با غلظت ۰/۲۵٪ امولسیفایر (نسبت اسپن۸۰ به توین ۸۰)، نخست به‌منظور تهیه فاز آبی، ۴ cc پلی‌سوربات یا توئین ۸۰ (امولسیفایر فاز آبی) به آب بدون یون در دمای محیط اضافه شد. محلول حاصل توسط همزن به مدت ۱۰ دقیقه همزده شد. فاز روغنی نیز با افزودن ۱ cc مونواولئات سوربیتان یا اسپن ۸۰ (امولسیفایر فاز روغنی) به ۲ cc و ۴cc از روغن کنجد آماده گردید. امولسیون اولیه (پیش امولسیون) با افزودن فاز روغنی به‌صورت قطره قطره به فاز آبی که توسط همزن مغناطیسی با دور ۵۰۰ دور در دقیقه در حال همگن شدن بود، تهیه شد. پس از افزودن کامل فاز روغنی، فرایند همگن‌سازی توسط همزن به مدت ۱۵ دقیقه ادامه پیدا کرد. در مرحله بعد، همگن‌سازی توسط همزن با دور بالاو با سرعت ۶۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به‌منظور شکسته شدن هرچه بیشتر قطرات روغن، پیش امولسیون تهیه شده به‌وسیله همگن‌ساز فراصوت مجهز به پروب تیتانیوم با قطر ۷ میلی‌متر، فرکانس ۵۰ کیلوهرتز ، همگن گردید. به این ترتیب نانوامولسیون نهایی حاصل شد (Homayounfal et al., 2013). در تهیه نانوامولسیون با غلظت امولسیفایر ۰/۵٪، تمامی مراحل یکسان بوده، با این تفاوت که فاز آبی، از افزودن ۲ cc، پلی‌سوربات به آب بدون یون، در دمای محیط تهیه گردید. همین روش، جهت آماده‌سازی نانوامولسیون بر پایه روغن بادام شیرین نیز به‌کارگرفته شد. در جدول ۱، تمامی تیمارها با توجه به زمان فراصوت، غلظت امولسیفایر، نوع و غلظت روغن به‌کار رفته، با علامت اختصاری معرفی شده‌اند.

اندازه‌گیری میانگین قطر ذرات امولسیون

متوسط اندازه قطره های نانوامولسیون تولید شده بر اساس میانگین قطر حجمی، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، براساس پراکنش نور لیزر (Vasco3– Cordouan، فرانسه) اندازه‌گیری و نتایج حاصل توسط نرم افزار دستگاه سنجش اندازه ذرات و طبق مدل فرانهوفر به صورت رابطه ۱، گزارش شد. در این رابطه، $D[4,3]$ میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل)[1] و n_i تعداد قطرات با قطر d_i بود (Pezeshky Najafabadi et al., 2018).

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (۱)$$

شاخص پراکنش ذرات

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد (Pezeshky Najafabadi et al., 2018).

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad (۲)$$

Span: معیار پراکندگی ذرات حول D (۵۰٪)

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

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

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

اندازه‌گیری نرخ کاهش کدورت

نمونه‌ها پس از انتقال به بطری‌های ۳۰۰ سی‌سی به‌صورت ثابت و بدون کوچکترین تحرک به مدت ۲۴ ساعت، در دمای محیط ۲۵درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد. مقداری نمونه با فاصله ۴ سانتی‌متر از انتهای بطری برداشته و جذب آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر (UV-VIS، Specord 210plus، Analytikjena، لمان) بررسی شد. جذب بالاتر نمونه‌ها بیانگر کدورت و پایداری بیشتر آن‌ها بود. جذب نمونه‌ها تا زمانی قرائت می‌شود که جذب به ۱۰ درصد جذب اولیه برسد. سپس نمودار جذب نسبت به زمان ترسیم شده و شیب خط حاصل به عنوان نرخ کاهش کدورت در نظر گرفته شدکه با پایداری نمونه‌ها رابطه عکس دارد (Floury et al., 2007).

اندازه‌گیری پایداری نانوامولسیون[2] (ESI)

در این آزمون، پس از تهیه امولسیون، ۱۵ میلی‌لیتر از نمونه به داخل لوله آزمایش ریخته و به طرز مناسبی دربندی شد تا از هرگونه تبخیر جلوگیری شود و حساسیت آن به جدایش گرانشی به‌وسیله اندازه گیری میزان لایه خامه‌ای شده یا ته نشین شده پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به کمک رابطه ۳ تعیین گردید.

1 Debroukere Mean

2 Emulsion Stablity Index

در این رابطه ارتفاع لایه جدا شده در بالای لوله (HC) اندازه‌گیری و شاخص پایداری نانوامولسیون برحسب ارتفاع اولیه امولسیون (HE) و ارتفاع لایه خامه‌ای شده با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد (Chanamai & McClements, 2001).

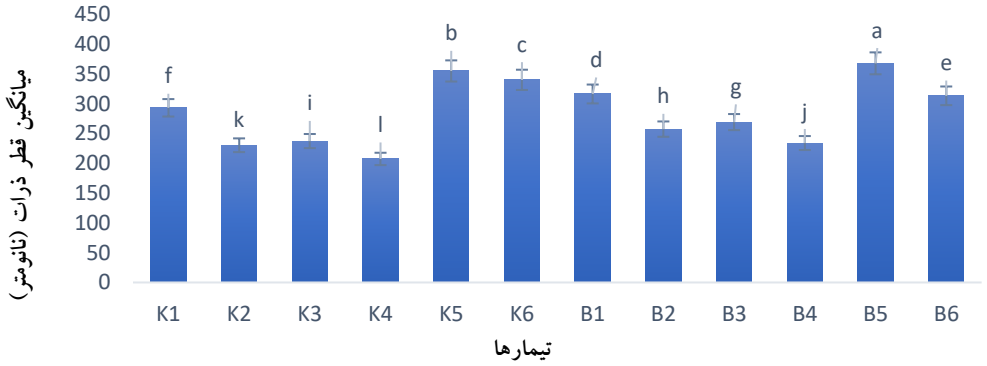
$$ESI = 100 \times \frac{HE - HC}{HE} \quad (۳)$$

پتانسیل زتا

برای مشخص شدن نحوه عمل نیروهای دافعه الکتروستاتیک بین قطره های نانوامولسیون و میزان پایداری سیستم حاصل از نتایج تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتا، از دستگاه زتا سایزر (Nano-ZS90، Malvern، انگلستان) استفاده شد. برای این منظور نمونه مورد نظر ابتدا با استفاده از آب مقطر ۱۰ برابر رقیق شده، سپس توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. پتانسیل زتا بر اساس فرکانس نوسان شدت نور و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. (Fatouros and Antimisiaris, 2002).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج از طریق تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح آماری ۵ درصد صورت گرفت. برای مدل‌سازی و تجزیه تحلیل از نرم‌افزار SPSS۱۸ و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel (۲۰۱۳) استفاده شد.



شکل ۱- بررسی میانگین قطر ذرات (نانومتر) در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و بادام شیرین

Fig. 1. Investigation of the average diameter of particles (nanometers) in different samples of nanoemulsion prepared from sesame and sweet almond oil

نتایج و بحث

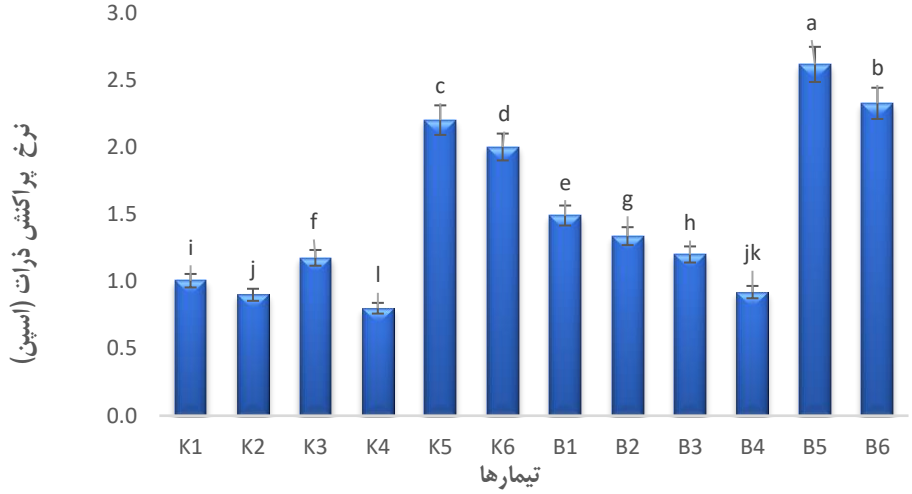
اندازه‌گیری میانگین قطر ذرات امولسیون

قطر ذرات در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و بادام شیرین در شکل ۱ آورده شده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تمامی نمونه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0.05$)، به‌طوری که کمترین و بیشترین میزان میانگین قطر ذرات به‌ترتیب مربوط به نمونه K_4 و B_5 بود. قطر متوسط ذرات به‌دست آمده تابع شدت برش است که از طریق دانسیته نیرو بیان می‌شود اما به زمان باقی ماندن در شدت برش نیز بستگی دارد. Schubert و Karbstein (۱۹۹۵) اعلام کردند این وابستگی بین زمان باقی ماندن و متوسط اندازه به دلیل توزیع نامتوازن دانسیته نیرو در ناحیه فاز پراکنده است (Karbstein and Schubert, 1995).

هر قدر زمان باقی‌ماندن در فرآیند افزایش یابد، ذرات شکسته شده روغن فرصت بیشتری خواهند داشت تا توسط امولسیفایر پوشیده شده و سبب جلوگیری از افزایش قطر ذرات می‌گردد. به دلیل این که عدم کفایت زمان سبب به هم پیوستن مجدد قطرات تازه شکل گرفته و در نهایت منجر به شکل‌گیری ذرات روغن با قطر بیشتر خواهد شد. (Chanamai & McClements, 2001; Buffo et al., 2001). بخشی از این اثر به دلیل محدودیت امولسیفایر در دسترس در امولسیون تولیدی است. بنابراین برخلاف تولید ذرات بسیار کوچک در طی فرایند هموژنیزاسیون، به دلیل کمبود ماده فعال سطحی، این ذرات سریعاً به یکدیگر چسبیده و منجر به کاهش کارایی فرایند همگن‌سازی می‌شود. از سوی دیگر افزایش شدت فرایند هموژنیزاسیون سبب تخریب غشای تشکیل شده توسط امولسیفایر شده و در نهایت سبب به هم پیوستن شدیدتر ذرات و افزایش قطر قطرات می‌گردد (Gharibzahedi et al., 2012; Kourniatis et al., 2010).

در مورد کاهش قطر قطرات ذرات تشکیل‌دهنده امولسیون با افزایش غلظت امولسیفایرهای به کار برده شده می‌توان این گونه توضیح داد که با افزایش غلظت امولسیفایرها، احتمال پوشش قطرات فاز پراکنده به وسیله امولسیفایرهای مورد استفاده (توئین ۸۰ و اسپن

۸۰ با نسبت اسپن به توئین: ۰/۵) افزایش می‌یابد. در نتیجه ذراتی که در زمان هموژن‌سازی کوچک شده‌اند، در غلظت‌های بالاتر امولسیفایرها بهتر پوشش داده می‌شوند (Unji et al., 1994; Harnsilawat et al., 2006). البته باید این نکته را در نظر گرفت که افزودن میزان بالای اسپن ۸۰، سیستم امولسیون را به میزان زیادی هیدروفوب کرده که در نتیجه قادر نخواهد بود امولسیون‌های روغن در آب را پایدار کند (Kentish et al., 2006). طی بررسی تاثیر نوع روغن بکارگرفته شده بر روی میانگین قطر ذرات برحسب نانومتر و طبق نتایج حاصل شده، در نانو امولسیون تهیه شده بر پایه روغن کنجد، ذرات ریزتر و کوچکتری گزارش گردید. با توجه به اینکه ویسکوزیته روغن بر سرعت مولکول‌های امولسیفایر غیریونی، در حرکت از فاز آلی به فاز آبی، مؤثر است، می‌توان انتظار داشت با کاهش ویسکوزیته روغن، مولکول‌های سورفاکتانت سریع‌تر حرکت کرده و بنابراین، قطره‌های کوچک‌تر تولید شود. همچنین کاهش کشش بین سطحی باعث تحرک بیشتر بین سطح شده و تشکیل قطره‌های ریز محتمل‌تر می‌شود. به همین علت ریزترین ذرات (۲۰۰ نانومتر) در تیمار k4 حاوی روغن کنجد و با حضور امولسیفایر در غلظت بالاتر (۰/۵٪) گزارش شد. Masah و همکاران (۲۰۱۳)، نیز در تحقیق خود روی تولید نانوامولسیون حاوی ویتامین E گزارش کردند در غلظت‌های بالاتر سورفاکتانت اندازه قطره‌ها کاهش می‌یابد (Masah et al., 2013). دلیل دیگری را که می‌توان علت افزایش اندازه قطره‌ها در غلظت‌های بالای سورفاکتانت دانست انبوهش ناشی از خالی شدن است. با افزایش زیاد غلظت سورفاکتانت، بخشی از آنها به جای قرار گرفتن در سطح، در توده قرار می‌گیرند و میسل‌های سورفاکتانت تشکیل می‌شود که باعث افزایش فشار اسمزی محلی در سیستم می‌شود. در نتیجه فاز پیوسته بین قطره‌ها به این مکان منتقل می‌گردد و موجب انبوهش (فلاکولاسیون[1])، ناشی از خالی شدن فاز پیوسته بین دو قطره می‌گردد (Ghanbarzadeh et al., 2013).



شکل۲- نرخ پراکنش ذرات (اسپن) در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و بادام شیرین

Fig. 2. The dispersion rate of particles (span) in different nanoemulsion samples prepared from sesame and sweet almond oil

شاخص پراکنش ذرات

شاخص اندازه پراکنش ذرات برحسب اسپن، در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و بادام شیرین در شکل ۱ آورده شده است. همان‌گونه که در شکل ۱، مشاهده می‌شود، تمامی نمونه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0.05$)، به‌طوری که کمترین و بیشترین میزان اندازه ذرات به‌ترتیب مربوط به نمونه K_4 و B_5 بود. به‌طورکلی امولسیون‌ها به‌وسیله فرایندهای برشی فیزیکی تهیه می‌شوند، اندازه نهایی امولسیون‌های هموژن شده به‌وسیله تقابل دو فرایند متضاد متلاشی شدن قطرات و به‌هم‌پیوستن دوباره قطرات تعیین می‌شود. فرکانس هر دو فرایند به‌وسیله برش‌های شدیدی که در همگن‌سازهای با برش بالا از قبیل فراصوت ایجاد می‌شود، تعیین می‌گردد. متلاشی شدن قطرات زمانی اتفاق می‌افتد که نیروی برشی به‌کار رفته بزرگتر از فشار لاپلاس امولسیون باشد (Homayounfal et al., 2013).

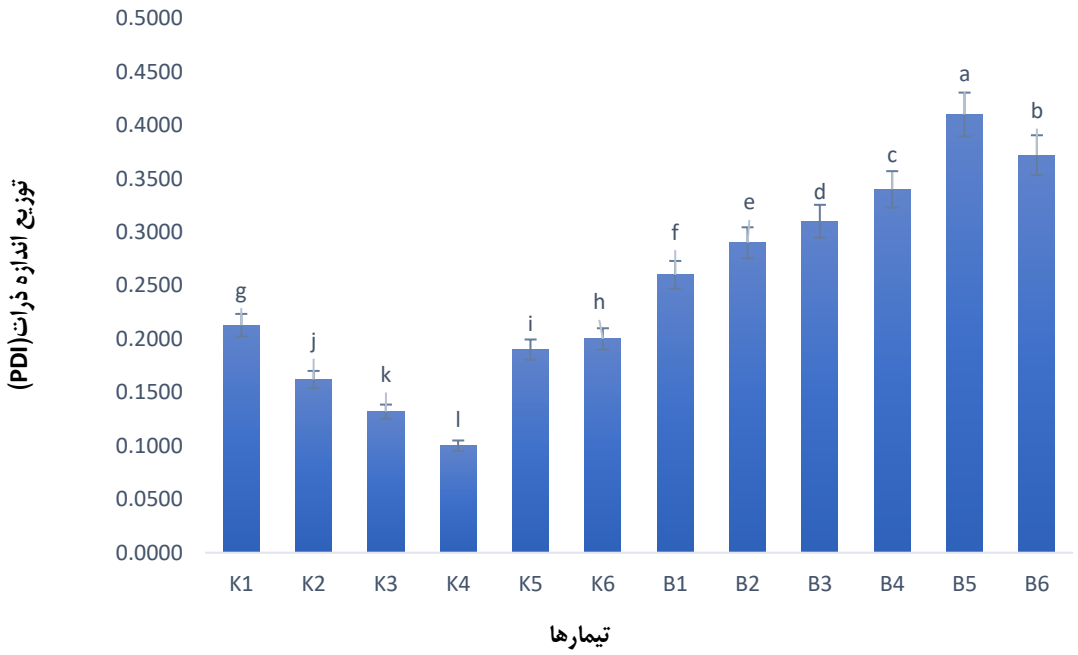
میزان روغن با اندازه ذرات امولسیون ارتباط مستقیم دارد. علت این پدیده را می‌توان این گونه توضیح داد که احتمالاً در غلظت‌های بالای روغن، امولسیفایر کافی برای پوشاندن ذرات روغن تازه شکل گرفته وجود ندارد. در نتیجه ذرات جدید شکل گرفته، به یکدیگر پیوسته و ذرات بزرگ‌تری را ایجاد می‌کنند. از سوی دیگر افزایش درصد روغن از ۲ به ۴ درصد ،باعث افزایش ویسکوزیته فاز پراکنده شده و سبب

[1] Flocculation

کاهش نرخ برش در طول فرایند هموژنیزاسیون و نهایتاً کاهش کارایی فرایند همگن‌سازی و ایجاد ذرات بزرگتر می‌گردد (Chanamai and McClements, 2001; Gharibzahedi et al., 2012).

توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات بعد از تعیین نوع امولسیون مهم‌ترین ویژگی یک امولسیون محسوب می‌شود زیرا پایداری و گرانروی امولسیون تابع اندازه قطرات و توزیع آن است . توزیع اندازه ذرات در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و بادام شیرین در شکل ۳ آورده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، تمامی نمونه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند ($p<0.05$)، به‌طوری که کمترین و بیشترین توزیع اندازه ذرات به ترتیب مربوط به نمونه K_4 (روغن کنجد ۲ درصد، زمان همگن‌سازی ۱۰ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) و B_5 (روغن بادام ۴ درصد، زمان همگن‌سازی ۵ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) بود. به همان نسبت میانگین قطر ذرات نمونه K4 نیز کمتر از B_5 است. باتوجه به شکل ۲و ۳، با کاهش قطر ذرات، توزیع اندازه ذرات محدودتر می‌شود.. مقادیر شاخص توزیع اندازه ذرات در تمام نمونه‌ها در زیر ۰/۳ مشاهده شد که نشانگر قابل قبول بودن توزیع اندازه ذرات است. اگرچه در نمونه B_5 این مقدار۰/۴ حاصل شده که بیشترین مقدار است و میزان امولسیفایر و مدت همگن‌سازی از عوامل موثر در افزایش هستند.



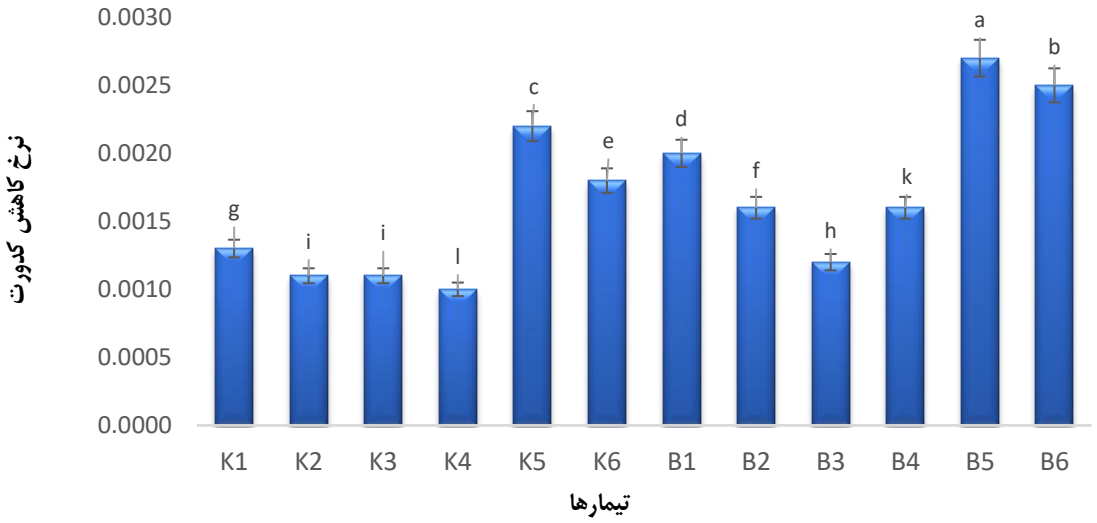
شکل ۳- بررسی توزیع اندازه ذرات در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و بادام شیرین

Fig. 3. Investigation of particle size distribution in different samples of nanoemulsion prepared from sesame and sweet almond oil

در تهیه نانوامولسیون ترکیب اجزاء و نسبت سورفاکتانت به امولسیون بر توزیع اندازه ذرات تاثیرگذار است (Komaiko and McClements, 2014). اگر غلظت امولسیفایر در سیستم برای پوشاندن کامل لایه بین سطحی روغن- آب کم باشد، درهم‌آمیختن و تجمع قطره‌ها رخ می‌دهد. دلیل کاهش اندازه قطره‌ها با افزایش غلظت سورفاکتانت را می‌توان در افزایش جذب مولکول‌های سورفاکتانت به سطح روغن-آب و در نتیجه کاهش بیشتر کشش سطحی بیان نمود. همچنین افزایش غلظت سورفاکتانت موجب می‌شود تا تعداد مولکول های بیشتری از سورفاکتانت از فاز روغنی به فاز آبی پخش شوند و تولید قطره‌ها ریز امولسیون آسان‌تر گردد (Saberi et al., 2013; Guttoff et al., 2015). در مورد بررسی تاثیر نوع روغن بکارفته بر این فاکتور نیز می‌توان گفت، از آنجاییکه تشکیل، پایداری و خصوصیات نانوامولسیون‌ها اغلب به خصوصیات فیزیکوشیمایی فاز روغن بستگی دارد، حضور روغن کنجد با توجه به قطبیت و کشش بین سطحی آن منجر به تشکیل نانوامولسیون با سایز ذرات ریزتر و توزیع اندازه ذرات یا عدد شاخص پراکندگی پایینتری در مقایسه با روغن بادام شیرین خواهد بود.

نرخ کاهش کدورت

نرخ کاهش کدورت در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و بادام شیرین در شکل ۴، آورده شده است. همانگونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، تمامی نمونه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0.05$)، به‌طوری که کمترین و بیشترین میزان نرخ کاهش کدورت به‌ترتیب مربوط به نمونه K_4 و B_5 بود.



شکل ٤- بررسی نرخ کاهش کدورت در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و بادام شیرین

Fig. 4. Investigation of turbidity reduction rate in different samples of nanoemulsion prepared from sesame and sweet almond oil

نرخ کاهش کدورت ناشی از به‌هم پیوستن ذرات فاز پراکنده و در نتیجه کاهش جذب نوری امولسیون‌ها است. افزایش غلظت امولسیفایر مورد استفاده، موجب کاهش نرخ کدورت نمونه‌ها گردید. افزودن غلظت‌های متفاوت از امولسیفایر به نمونه‌های تهیه شده موجب می‌شود تا لایه‌های با ضخامت متفاوت از امولسیفایر در اطراف قطرات روغن شکل بگیرد. در غلظت‌های بالاتر امولسیفایر به علت در دسترس بودن بیشتر امولسیفایر، لایه‌های ضخیم‌تری از آن در اطراف قطرات روغن قرار گرفته است. در نتیجه قطر این قطرات کمتر مورد تغییر قرار گرفته و موجب کاهش در میزان نرخ کدورت شده است (Taherian et al., 2006). به‌عبارتی، غلظت های بالاتر امولسیفایر سبب افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته شده و سرعت حرکت فاز پراکنده به سطوح بالایی را کاهش داده و در نتیجه سبب تأخیر در کاهش کدورت نمونه ها می‌گردد. Pezeshky Najafabadi و همکاران (۲۰۱۸)، بیان نمودند ارتباط خطی میان جذب نور و محتوای روغن در نانوامولسیون‌ها وجود دارد (Pezeshky Najafabadi et al., 2018).

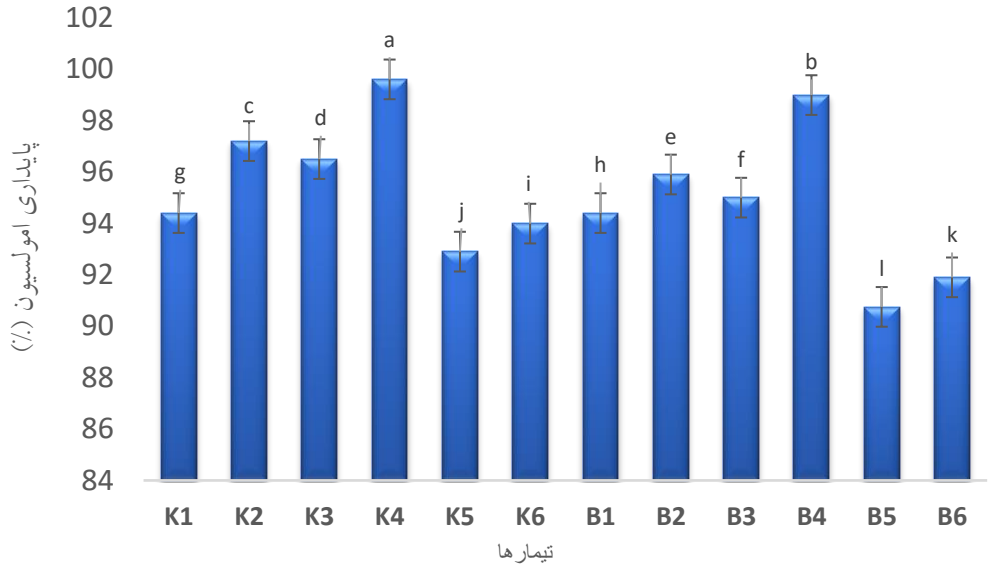
پایداری نانو امولسیون

پایداری در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و روغن بادام شیرین در شکل ۵ آورده شده است. همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود، تمامی نمونه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0.05$)، به‌طوری که کمترین و بیشترین میزان پایداری ذرات به‌ترتیب مربوط به نمونه B_5 (روغن بادام ۴ درصد، زمان همگن‌سازی ۵ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) و K_4 (روغن کنجد ۲ درصد، زمان همگن‌سازی ۱۰ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) بود.

اصولاً یکی از مولفه‌های مهم در ارزیابی امولسیون‌ها پایداری است؛ میزان پایداری هر سامانه امولسیونی بستگی زیادی به نوع و مقدار عوامل امولسیون‌کننده، میزان نیروهای بینابینی عمل‌کننده در سطح قطرات فاز پراکنده، اندازه قطرات فاز پراکنده، گرانروی فاز پیوسته، و اختلاف چگالی فازهای پراکنده و پیوسته دارد. علاوه بر عوامل یاد شده، به‌طور کلی چهار سازوکار (مکانیسم) با عناوین پایداری الکترواستاتیکی، پایداری فضایی، پایداری به‌وسیله ذرات جامد، و پایداری از طریق افزایش گرانروی در ایجاد پایداری و ثبات امولسیون‌ها حائز اهمیت هستند (McClements, 1999; Tadros et al., 2004). معمولاً پایداری الکترواستاتیکی به‌وسیله نیروهای جاذبه واندروالسی و نیروهای دافعه حاصل از انتشار بارهای الکتریکی در سطح مشترک فازها ایجاد می‌گردد. پایداری فضایی نیز هنگامی اتفاق می‌افتد که علاوه بر آب و روغن، درشت مولکول‌ها (بیوپلیمرها یا زیست‌بسپارها) نیز در سامانه امولسیون وجود داشته باشند. در این حالت، درشت مولکول‌ها روی سطح قطرات امولسیون جذب می‌شوند، به طوری که یک بخش کوچک

از درشت مولکول در قسمت سطحی قطره روغن و قسمت اعظم ساختمان هیدراته آن در فاز آبی باقی می‌ماند. به این ترتیب، با استقرار فازها، بین قطرات روغن و فاز آبی اتصال برقرار می‌شود. در ضمن، جذب سطحی ذرات بسیار ریز در سطح مشترک فازهای پراکنده و پیوسته نیز قادر است از طریق ایجاد تعادل انرژی در سطح مشترک فازهای جامد- مایع و مایع- مایع سبب پایدارسازی امولسیون شود.

همچنین، افزایش گرانروی فاز پیوسته موجب ثبات و پایداری امولسیون می‌شود (Dickinson, 2009). Pezeshky Najafabad و همکاران (۲۰۱۸)، بیان نمودند پایدای سیستم نانوامولسیون تولیدی نسبت به تفکیک گرانشی هم می‌تواند به اندازه کوچک قطره‌ها نسبت داده شود، زیرا سرعت خامه‌بستن یک قطره لیپیدی با افزایش شعاع قطره افزایش می‌یابد (Pezeshky Najafabadi et al., 2018).



شکل ۵- بررسی پایداری در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و روغن بادام شیرین

Fig. 5. Investigation of stability in different samples of nanoemulsion prepared from sesame oil and sweet almond oil

در رسیدگی استوالد، مولکول‌های روغن از قطره‌های کوچک، از طریق فاز آبی به قطره‌های درشت‌تر انتشار می‌یابند. به این ترتیب قطره‌های کوچک، کوچک‌تر و قطره‌های بزرگ، بزرگ‌تر می‌شوند و به تدریج در طول زمان، اندازه متوسط قطره‌ها در امولسیون یا نانوامولسیون افزایش می‌یابد. در عمل مهم‌ترین عاملی که پایداری نانوامولسیون به رسیدگی استوالد را تعیین می‌کند، حلالیت روغن در فاز آبی است (McClements, 2005). اگر نانوامولسیون با روغن‌هایی تولید شود که عمدتاً متشکل از تری‌آسیل گلیسرول‌های زنجیر کوتاه باشد، نسبت به رسیدگی استوالد مقاوم نخواهد بود. با انتشار مولکول‌های فاز پراکنده از قطره‌های ریز به درشت، به تدریج غلظت این ترکیبات درون قطره‌های ریز افزایش می‌یابد (Ostertag et al., 2012). سرعت خامه‌بستن یک قطره لیپیدی با افزایش قطر قطره‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین امولسیون‌های حاوی قطره‌های بزرگ‌تر سریع‌تر از آنهایی که حاوی قطره‌های کوچک‌تر هستند، خامه خواهند بست (McClements, 2005). Pezeshky Najafabad و همکاران (۲۰۱۸) بیان نمودند نمونه‌های که حاوی قطره‌های بزرگ‌تر بوده‌اند و یا پس از گذشت زمان دچار افزایش در میانگین قطر قطره‌ها شده‌اند که این امر به احتمال زیاد متاثر از کاهش غلظت سورفاکتانت در آنهاست، می‌توانند نسبت به خامه‌بستن ناپایدر باشند (Pezeshky Najafabadi et al., 2018). با توجه به وابستگی فاکتور پایداری نانوامولسیون‌ها با خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن مانند نوع ساختار و ساختمان زنجیره‌های روغن، کشش سطحی، ویسکوزیته ، حلالیت روغن در آب و رفتار فازی روغن ها، نانوامولسیون تهیه شده بر پایه روغن کنجد، در غلظت پایین‌تر روغن و نسبت بالاتر امولسیفایر اسپن به توین از پایداری بالاتری در مقایسه با روغن بادام شیرین برخوردار است. زمان هموژنیزاسیون و نسبت غلظت امولسیفایر اثر مثبت و غلظت روغن تاثیر منفی بر اندازه ذرات امولسیون دارند. بنابراین می‌توان چنین برداشت کرد که در نسبت‌های پایین غلظت امولسیفایر، میزان امولسیفایر به‌منظور پوشش دادن سطح تمام قطرات کافی نبوده و همین مسئله سبب شده است در غلظت‌های پایین نسبت غلظت امولسیفایر، شاهد ناپایداری بیشتری در امولسیون‌ها باشیم. طبق نتایج ، نمونه k_4 با حضور روغن کنجد در غلظت ۲٪ و غلظت امولسیفایر ۰/۵٪ با ۹۸/۷٪ بالاترین میزان پایداری را داشت.

پتانسیل زتا

پتاسیل زتا در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و روغن بادام شیرین در شکل ۶ آورده شده است. همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود، تمامی نمونه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0.05$)، به‌طوری که کمترین و بیشترین میزان پتاسیل زتا به ترتیب مربوط به نمونه B_5 (روغن بادام ۴ درصد، زمان همگن‌سازی ۵ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) و K_4 (روغن کنجد ۲ درصد، زمان همگن‌سازی ۱۰ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) بود.

شکل ٦- بررسی پتاسیل زتا در نمونه‌های مختلف نانو امولسیون تهیه شده از روغن کنجد و روغن بادام شیرین

Fig. 6. Investigation of zeta potential in different nanoemulsion samples prepared from sesame oil and sweet almond oil

پتاسیل زتا معیاری از بار کلی روی سطح ذرات است، هرچه اندازه بارهای هم‌نام روی سطح قطره‌ها و ذرات موجود در سیستم بیشتر باشد، نیروی دافعه بین آنها بیشتر می‌شود. سطح ذرات و قطره‌ها در سیستم های کلوئیدی، به دلیل ماهیت ذاتی و یا جذب لایه سورفاکتانت یونی، دارای بار الکتریکی است. بار الکتریکی قطره‌ها به عواملی چون نوع و غلظت سورفاکتانت مورد استفاده روی سطح قطره‌ها و شرایط محیطی (pH، دما و قدرت یونی) بستگی دارد. شایان ذکر است که پتانسیل زتای کم تر از ۳۰- و بیشتر از ۳۰+ میلی‌ولت بیانگر ایجاد شرایط مناسب برای جلوگیری از از وقوع پدیده‌های ناپایداری مانند به‌هم‌پیوستگی و یا در هم آمیختگی قطرات می‌باشد. در این شرایط قطرات روغن به دلیل ایجاد نیروهای دافعه ای تمایل به نزدیک شدن، به هم پیوستن و تجمع ندارند که این موضوع تاثیر مثبتی بر پایداری امولسیون می‌گذارد (Emadzadeh et al., 2015). افزایش غلظت و ظرفیت الکترولیت‌ها (بیشتر یون‌های نمکی) و ترکیبات باردار یونیزه موجود در محیط باعث افزایش قدرت یونی محیط می‌شود که این افزایش، باعث کاهش نیروی‌های دفعی الکترواستاتیک و در نتیجه باعث افزایش ناپایداری می‌شود و احتمال انبوهش قطره‌ها افزایش می‌یابد (Pezeshky Najafabadi et al., 2018). مطابق نتایج، پتانسیل زتا در نمونه k_4، ۳۳- میلی‌ولت برای نانوامولسیون تهیه شده توسط روغن کنجد گزارش گردید که مبین ایجاد شرایط مساعد به‌منظور پایداری بالاتر این تیمار می‌باشد. Thanida و همکاران (۲۰۱۹)، در بررسی اثر غلظت سورفاکتانت بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی نانوامولسیون های کورکومین تحت شرایط مربوط به استفاده تجاری دریافتند که با افزایش غلظت و ترکیب توین ۸۰ و لستین، پتانسیل زتا کاهش یافت. در واقع توین ۸۰ با کاهش کشش سطحی را در طول فرایند امولسیفیکاسیون کاهش خواهد داد (Thanida et al, 2019). Hong و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی نسبت آب دوستی به چربی دوستی HLB[9] بر خصوصیات امولسیون روغن در آب دریافتند که مقادیر پتانسیل زتا در یک امولسیون پایدار بالا و در زمان ناپایداری(آگلومریزاسیون و فلوکولاسیون قطرات)، پایین خواهد بود.امولسیون‌های با اندیس HLB بیشتر از ۱۱، اندیس زتا پتانسیل

[9] Hydrophilic Lipophilic Balance

بالاتری نسبت به امولسیون‌های با اندیس HLB کمتر از ۱۰ دارند (Hong et al, 2018).

نتیجه‌گیری

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مختلفی روی تولید، خواص فیزیکوشیمیایی، رئولوژی و پایداری قطره‌های امولسیون مؤثر بوده و ویژگی‌های آنهتپا را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این بررسی از روغن کنجد و روغن بادام شیرین به‌عنوان ترکیبی فراسودمند جهت تولید نانوامولسیون‌های روغن در آب استفاده شد. پس از تهیه نانوامولسیون، با تغییر پارامترهای غلظت روغن و امولسیفایر طی دو زمان همگن سازی، برخی خصوصیات و ویژگی‌ها مانند قطر ذرات، شاخص پراکنش ذرات، نرخ کاهش کدورت، پایداری و پتاسیل زتا، به‌منظور انتخاب نانوامولسیون مناسب مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج با استفاده از امولسیفایر غیریونی اسپن و توین ۸۰ در غلظت ۰/۵٪ و فاز روغنی کنجد با غلظت ۲٪، تولید ذراتی در اندازه ۲۰۰ نانومتر، همراه با پایداری مناسب امکان‌پذیر است. نتایج نشان داد، میزان اندازه ذرات، میانگین قطر ذرات و نرخ کاهش کدورت نمونه ها، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشته، به‌طوری که کمترین و بیشترین مقادیر به‌ترتیب متعلق به نمونه K_4 (روغن کنجد ۲ درصد، زمان همگن‌سازی ۱۰ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) و B_5 (روغن بادام ۴ درصد، زمان همگن‌سازی ۵ دقیقه و نسبت غلظت امولسیفایر ۰/۵ درصد) گزارش گردید ($p<0.05$). همچنین، نانوامولسیون بهینه تولید شده (k_4)، از نتایج قابل قبولی در میزان پایداری و پتانسیل زتا به‌ترتیب با مقادیر ۹۸/۷٪ و ۳۳- میلی‌ولت برخوردار بود .

منابع

1. Buffo, R. A., Reineccius. G. A., Oehlert, G. W. (2001). Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. *Journal of Food Hydrocolloid*. 15: 53-66. 14. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00050-3
2. Chanamai, R., McClements, D. J. (2001). Depletion Flocculation of Beverage Emulsions by Gum Arabic and Modified Starch. *Journal of Food Science*. 66 (3): 457-63.
3. Coupland, J. N., McClements, D. J. (2001). Droplet size determination in food emulsions: comparison of ultrasonic and light scattering. *Journal of Food Engineering*. 50: 1117-20. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00201-6
4. Dickinson, E. (2009). Hdrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Journal of Food Hydrocolloids*. 23: 1473–1482. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005
5. Deman, J. M. (1990). *Principles of Food Chemistry*. (2nd Ed). Van Nostrand Reinhold. New York.
6. Emadzadeh, B., Kadkhodaee, R., Khalesi, H. (2015). The effect of Persian gum and thermal process on the properties of emulsion stabilized by whey protein concentrate. *Journal of Innovative Food Technologies*.13:103-119
7. Fatouros, D. G., Antimisiaris, S. G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *Journal of Colloid and Interface Science*. 251(2):271-277. https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8432
8. Floury, J., Desrumaux, A., Lardie`res, J. (2007). Effect of high pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Journal of Innovative Food Science Emerg Technology*. 1: 127-34. https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00012-6
9. Homayounfal , M., Khodaeian, F, Mousavi, S. M., Hosseini Panjaki, S. M. (2013). Preparation and evaluation of properties of emulsions based on walnut oil. *Journal of. Iranian Food Science and Technology*.8(2).PP:191-199.
10. Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., NikNia, N. (2013). Chemistry and physics of colloidal systems and food biopolymer solutions .Sharif University of Technology, Scientific Publishing Institute
11. Ghomashchi, T. (2007). Emulsion Technology. University of Tehran Publishing.
12. Gutierrez, J. M., Gonzalez, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C. M. and Nolla, J. (2008). Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation. *Journal of Current Opinions in Colloid & Interface Science*. 13: 245–251. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.005
13. Gharibzahedi, S. M. T, Mousavi S. M, Hamedi M, Ghasemlou M. (2012). Response surface modeling for optimization of formulation variables and physical stability of walnut oil-in-water beverage emulsions. *Journal of Food Hydrocolloid*. 26: 293-301. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.006
14. Guttoff, M., Saberi, A. H., McClements, D. J. (2015). Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability. *Journal of Food Chemistry*, 171:117-122. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.087
15. Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., McClement, D. J. (2006). Stabilizing of model beverage cloud emulsions using protein-polysaccharide electrostatic complexes formed at the oil-water interface ". *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 54: 5540-47. https://doi.org/10.1021/jf052860a

16. Hong, K., Kim, S., Seung Bum, L. (2018). Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. Accepted Manuscript. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.06.022
17. Jacobsen, C. (2010). Enrichment of foods with omega-3 fatty acids: a multidisciplinary challenge. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1190(1): 141-150.
18. Kentish S, Wooster T. J, Ashokkumar W, Paul T, McClements D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology ". *Journal of Food Science*. 71 (9): 107-16.
19. Kourniatis. L. R, Spinelli. L. S, Mansur R. E. (2010). Formation of orange oil in water nanoemulsions using nonionic surfactant mixture by high pressure homogenizer. *Colloidal journal*. 72 (3): 396- 402.
20. Karbstein. S, Schubert. H. (1995). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Journal of Innovationin Food Science. Emerg. Technology*. 9: 170-175.
21. Komaiko, J., McClements, D. J. (2014). Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. *Journal of Colloidal and Interface Science*.425:59-66. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.03.035
22. Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., and Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Journal of Ultrason. Sonochemistry*. 16: 721–727. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.008
23. Li, P. H. and Chiang, B. H. (2012). Process optimization and stability of D-limonene-in water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Journal of Ultrason. Sonochem*. 19: 192–197. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.017
24. Masah, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishe Kar, H., Soti Khiabani, M. (2013). The Effect of alpha-tocopherol-containing oil phase in the production of nano-emulsion using low-energy method *twenty-first National Congress of Food Science and Technology*.
25. McClements, D. J. (1999). Foods Emulsions: Principles, Practice, and Techniques. Florida: CRC Press LLC.
26. McClements, D. J. (2005). Food Emulsions: Principles, Practice and Technology. CRC Press: Boca Raton, Florida.
27. Mirhosseini, H., Tan, C. P., Abdul hamid, N. S., Yusof, S. (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil on flavor release from diluted orange beverage emulsion. *Journal of Food chemistry*. 107: 1161-72. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.07.007
28. Ostertag, T., Weiss, J., McClements, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*. 388(1): 95-102. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.089
29. Pezeshky Najafabadi, A., Hashemi, F. S., Marandi, A., Gharedaghi, K., Jalali, S. H. (2018). Factors Affecting the Production and Stability of Optimal Formulation of Nanoemulsion Containing Vitamin A and D by Spontaneous Production. *Journal of Research and Innovationin Food Science and Technology*. Vol 7 (3). 255-268
30. Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., McClements, D. J. (2011). Comparison of biopolymer emulsifier performance in formation and stabilization of orange oil-in-water emulsions. *Journal of Am Chem Soc*. 88:47-55. https://doi.org/10.1007/s11746-010-1658-y
31. Rao, J. and McClements, D. J. (2011). Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation method. *Journal of. Agric. Food Chemistry*. 59: 5026–5035. https://doi.org/10.1021/jf200094m
32. Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*. 391:95-102. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.069
33. Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. Current opinion in colloid & interface science, 10(3-4), 102-110. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004
34. Silva, H. D., Cerqueira, M. N., Vicente, A. A. (2012). Food Bioprocess Technology. 5: 854–867.
35. Taherian AR, Fustier P, Ramaswamy HS. (2006). Effect of added oil and modified starch on rheological properties, droplet size distribution, opacity and stability of beverage cloud emulsions ". *Journal of Food Engineering*. 77: 687-96. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.073
36. Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. and Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. Adv. *Colloid Interface Science*. 108–109: 303–318. https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023
37. Unji. M, Ueda. H, Ogata. M, Nakagaki. M. (1994). Studies on the oil in water emulsions stabilized with gum Arabic by using the turbidity ratio method. *Yakugaku Zasshi*. 112: 906–13.
38. Thanida, C., Prasongsuk, S., Sabliov, C. M. (2019). Effect of Surfactant Concentrations on Physicochemical Properties and Functionality of Curcumin Nanoemulsions under Conditions Relevant to Commercial Utilization. *Molecules*, 24, 2744.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 527- 541

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۴۱-۵۲۷

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

Full Research Paper

Preparation and evaluation some properties of pH indicator film based on Arabic gum- Carboxy methyl cellulose composite film containing of Violet basil (*Ocimum basilicum*. L) Anthocyanin

Amir Rezaei[1], Masoud Rezaei*[1], Mehdi Alboofetileh[2]

Received: 2021.04.05
Revised: 2021.06.26
Accepted: 2021.07.25
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Rezaei, A., Rezaei, M., Alboofetileh, M. (2022). Preparation and evaluation some properties of pH indicator film based on Arabic gum- Carboxy methyl cellulose composite film containing of Violet basil (*Ocimum basilicum*. L) Anthocyanin. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 527-541.

Abstract

Introduction: Nowadays, pH indicator has engrossed wide attention because of its eligibility to monitoring shelf life. Intelligent packaging is authoritative of detecting, sensing, tracing, recording and communicating properties to provide information is communicated directly through color changes. In the meantime, natural anthocyanins are non-toxic, water-soluble and safe dye that are indicator to pH change. Anthocyanins are a large group of natural dyes. Some natural anthocyanin, such as anthocyanin extracted from mulberry, black bean, blueberry and violet basil (*Ocimum basilicum*) are used to spoilage monitoring. In present study, an intelligent pH-indicator film based on Arabic gum- Carboxymethyl cellulose incorporated with Violet basil (*Ocimum basilicum. L*) Anthocyanin was prepared and its properties including structural, physical, mechanical, thermal, antioxidant activity and color sensitivity to changing pH and ammonia gas were evaluated.

Materials and methods: For this purpose, at first anthocyanin of Violet basil was extracted and its color reactions were investigated. In next step, the extracted anthocyanin was added to Arabic gum- Carboxymethyl cellulose at different concentrations (40, 60 and 80 mg/100 g film formation solution) and their properties were evaluated.

Results and discussion: The results of FTIR and XRD tests showed that the extracted anthocyanin was successfully dissolved in the composite film. Addition of anthocyanin to film matrix led to increasing the WVP and antioxidant activity and decreasing the water contact angle, elongation at break (EB) and thermal properties. The tensile strength value of the prepared films increased from 19 to 23.64 MPa with increasing anthocyanin content from 0 to 60 mg/100 g film solution; but, it decreased with further increase of the anthocyanin content. Exposing the indicator films to ammonia gas and different pHs led to changing the color changes from red to yellow. These color variations of films were consistent with the color changes of the anthocyanin solution. This result indicates that the films prepared sensitive to pH change, and observed different color in films as the solution is changed from acidic to alkaline because causes its structural changes. The structure of anthocyanin is yellow salt ions in acidic solutions, is converted to quinoidal in weak alkaline solutions, and becomes unstructured in high pH solutions.

In this study, pH indicator films were prepared based of Carboxymethyl cellulose and Arabic gum containing violet basil anthocyanin. The developed films are non-toxic and biodegradable and provide visible color response. Based on

1. Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
2. Iran Fish Processing Technology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.
(*Corresponding Author Email: rezaie_ma@modares.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69500.1030

these results can be concluded that the indicator film prepared in present study could be used as intelligent food packaging for visual evolution of freshness/spoilage in food products.

Keywords: Arabic gum, Carboxy methyl cellulose, pH indicator film, Violet basil anthocyanin.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 527- 541

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۴۱-۵۲۷

مقاله علمی-پژوهشی

تهیه و ارزیابی ویژگی‌های شناساگر حساس به pH بر پایه فیلم کامپوزیتی صمغ عربی-کربوکسی متیل سلولز حاوی آنتوسیانین ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*. L)

امیر رضائی[۱]- مسعود رضائی[۲*]- مهدی آل بوفتیله[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۰۳

چکیده

در این تحقیق، بسته‌بندی هوشمند حساس به pH بر پایه فیلم کامپوزیتی صمغ عربی- کربوکسی متیل سلولز حاوی آنتوسیانین ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*. L) تهیه شد و ویژگی‌های ساختاری، فیزیکی، مکانیکی، حرارتی، آنتی‌اکسیدانی و حساسیت رنگی نسبت به pHهای مختلف و گاز آمونیاک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا آنتوسیانین‌های ریحان بنفش استخراج و حساسیت رنگی آن‌ها سنجش گردید. در مرحله بعد آنتوسیانین‌های استخراج شده در سه غلظت ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر به ماتریس پلیمری فیلم کامپوزیت صمغ عربی- کربوکسی متیل سلولز اضافه و ویژگی‌های مختلف آن ارزیابی گردید. نتایج آزمون‌های FTIR و XRD نشان داد که آنتوسیانین استخراج شده به‌خوبی در ساختار فیلم کامپوزیتی صمغ عربی- کربوکسی متیل سلولز قرار گرفته است. اضافه شدن آنتوسیانین به ماتریس پلیمری سبب افزایش نفوذپذیری به بخار آب ($۴/۷۳\ g\ pas^{-1}\ m^{-1}\ s^{-1}$) و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین کاهش زاویه تماس (۵۵/۳۳ درجه)، کشش‌پذیری (۱/۵۶٪) و دمای انتقال ذوب گردید. مقاومت کششی فیلم‌های تهیه شده با افزایش میزان آنتوسیانین (صفر تا ۶۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم محلول فیلم) از میزان ۱۹ تا ۲۳/۶۴ مگاپاسکال افزایش یافت اما با افزایش بیشتر میزان آنتوسیانین، کاهش یافت. قرار گرفتن فیلم شناساگر تهیه شده در معرض گاز آمونیاک و pHهای مختلف، منجر به تغییر رنگ فیلم‌ها از رنگ قرمز به رنگ زرد گردید. این تغییرات رنگی فیلم‌ها با تغییرات رنگی محلول آنتوسیانین همخوانی داشت. براساس این نتایج می‌توان اظهار داشت که فیلم شناساگر تهیه شده در این پژوهش می‌تواند به‌عنوان بسته‌بندی هوشمند جهت ارزیابی چشمی تازگی و فساد در محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، ریحان بنفش، صمغ عربی، فیلم حساس به pH، کربوکسی متیل سلولز.

مقدمه

در سال‌های اخیر، توسعه بسته‌بندی‌های هوشمند با هدف ارزیابی فساد محصولات غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. در واقع، هدف از این نوع بسته‌بندی‌ها، دستیابی به اطلاعاتی در رابطه با ایمنی و تازگی محصول غذایی می‌باشد (Pereira and Arruda, 2015; Suppakul., 2014). بسته‌بندی‌های هوشمند به‌واسطه بهره‌گیری از تغییرات ظاهری اجزایی مثل شناساگرهای زمان- دما، شناساگرهای گازی و زیست‌حسگرها، اطلاعاتی را در رابطه با میزان تازگی و یا تغییرات نامطلوب ناشی از فساد محصول غذایی به نمایش می‌گذارند. یکی از روش‌های ساخت بسته‌بندی هوشمند استفاده از شناساگرها می‌باشد. در این رابطه شناساگرهای حساس به pH به‌واسطه کارکرد مناسب و کاربرد ساده خود می‌توانند میزان فساد و یا حتی تازگی محصول بسته‌بندی شده را به نمایش بگذارند (Zhang et al., 2014; Ma and Wang, 2016). از آنجایی که فساد اغلب مواد غذایی با تغییرات pH همراه است (Chun et al., 2014)، لذا تاکنون شناساگرهای مختلفی با استفاده از رنگ‌های شیمیایی تهیه شده است (Kuswandi et al., 2012). اما در سال‌های اخیر تقاضا برای کاهش استفاده از ترکیبات شیمیایی مصنوعی به دلیل امکان ایجاد اثرات سوء بر سلامت انسان رو به افزایش می‌باشد (Zhang et al., 2014).

۱- دانشجوی دکتری، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس ، نور، ایران.
۲- استاد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس ، نور، ایران.
۳- استادیار، مرکز ملی تحقیقات فرآوری آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: rezaie_ma@modares.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69500.1030

پتانسیل استفاده از رنگ‌های طبیعی برای سنجش فساد در سیستم‌های بسته‌بندی هوشمند به دلیل عدم ایجاد آلودگی‌های زیستی و عدم سمیت برای انسان در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Yoshida et al., 2014; Zhang et al., 2014). در میان رنگ‌های طبیعی گیاهان مثل آنتوسیانین‌ها با دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر حساسیت رنگی به pHهای مختلف، توجهات را به‌خود جلب کرده‌اند. آنتوسیانین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند که به‌عنوان دارو در بسیاری از کشورها پذیرفته شده‌اند. این ترکیبات در میوه‌ها و سبزی‌ها وجود دارند. این رنگدانه‌ها با ممانعت در برابر اکسیداسیون چربی‌ها ارزش غذایی محصول را حفظ کرده و در صنایع مختلف دیگر نیز کاربردهای گسترده‌ای دارند (Close et al., 2003).

ریحان بنفش (*Ocimum basilicum. L*) گیاهی دارویی و معطر است که به لحاظ دارا بودن مقدار زیادی اسانس در اندام‌های رویشی، کاربردهای گسترده‌ای در درمان بسیاری از بیماری‌ها دارد. این گیاه حاوی رنگدانه‌های طبیعی از جمله آنتوسیانین می‌باشد که به‌واسطه دارا بودن این ترکیب، قابلیت تغییر رنگ در pHهای متفاوت را دارد (Tilebeni., 2011; Sajjadi., 2003). بر این اساس استخراج آنتوسیانین از گیاهان حاوی این رنگدانه و افزودن آن در بستر فیلم‌های زیستی می‌تواند به‌عنوان راهکاری برای تهیه شناساگرهای حساس به pH محسوب شود. پیشتر Zhang و همکاران (۲۰۱۴) آنتوسیانین استخراج شده از چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) را در بستر فیلم کامپوزیت کیتوزان-نشاسته اضافه نمودند و دریافتند که با افزایش مدت زمان ماندگاری و افزایش pH رنگ شناساگرها از قرمز به زرد تغییر می‌کند (Zhang et al., 2014).

پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها از مهم‌ترین ترکیبات مورد استفاده در تهیه فیلم‌های زیستی هستند. در این رابطه می‌توان به کازئین، کلاژن، ژلاتین، سلولز، پکتین، دکسترین، نشاسته، نشاسته‌های اصلاح شده، کیتوزان، کاراژینان، آلژینات و صمغ‌ها اشاره کرد (Mariniello et al., 2003; Ojagh et al., 2010). کربوکسی متیل سلولز از مشتقات سلولز است که به دلیل قیمت ارزان، تشکیل فیلم‌های شفاف، خاصیت بازدارندگی نسبت به اکسیژن و چربی‌ها قابلیت استفاده در تهیه فیلم های زیست تخریب‌پذیر را دارد. صمغ‌ها نیز از سایر ترکیباتی هستند که در صنایع غذایی و تهیه فیلم‌ها به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. مطالعاتی در زمینه استفاده از صمغ عربی به‌عنوان ماده اولیه در تولید فیلم زیستی صورت گرفته است (Xu et al., 2019; Amalraj et al., 2020; Rezaei et al., 2019) که به‌منظور بهبود خواص آن‌ها در هر یک از مطالعات فیلم صمغ عربی به‌صورت ترکیبی با سایر پلیمرها تهیه شده است. در این مطالعه نیز از ترکیب صمغ عربی با کربوکسی متیل سلولز به‌عنوان روشی برای بهبود خواص فیلم‌های تهیه شده استفاده شد.

هدف از پژوهش حاضر تهیه فیلم شناساگر حساس به pH و ارزیابی ویژگی‌های مختلف ساختاری، فیزیکی، مکانیکی، حرارتی و آنتی اکسیدانی آن می‌باشد. بدین منظور ابتدا فیلم کامپوزیت از ترکیب صمغ عربی-کربوکسی متیل سلولز تهیه گردید. در ادامه آنتوسیانین استخراج شده از ریحان بنفش به‌منظور القای خاصیت شناساگری به بستر فیلم‌ها اضافه شد. در پایان نیز ویژگی‌های ساختاری، فیزیکی، مکانیکی، حرارتی، آنتی اکسیدانی، پاسخ رنگی در pHهای مختلف و همچنین حضور آمونیاک فیلم‌های تهیه شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

صمغ عربی و ریحان بنفش از بازارهای محلی تهیه گردید. کربوکسی متیل سلولز، گلیسرول، سود و اسید کلریدریک از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

استخراج آنتوسیانین

استخراج آنتوسیانین از ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*) با استفاده از روش (Choi et al., 2017) انجام شد. بدین منظور ۱۰ گرم از پودر ریحان بنفش به ظرف حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۵ درصد اضافه شد. سپس عصارهگیری به مدت ۲ ساعت و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. فاز مایع عصاره‌ها با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شده و در ادامه توسط دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. عصاره تغلیظ شده توسط دستگاه فریزردرایر خشک شده و تا استفاده بعدی در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تغییرات رنگی محلول آنتوسیانین نسبت به pH

پودر خشک آنتوسیانین استخراج شده به میزان ۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه به آرامی توسط همزن مغناطیسی حل شد و به نسبت ۱:۱ به محلول‌های pH اضافه شد. در مرحله بعد تغییرات رنگی ایجاد شده در محلول‌هایی با pH ۲ تا ۱۳ که توسط اسید کلریدریک (HCL) و سود (NaOH) تهیه شده بودند؛ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. عکس برداری از تغییرات رنگی ایجاد شده در محلول‌ها نیز انجام شد (Choi et al., 2017).

تهیه فیلم‌های شناساگر حساس به pH

برای تهیه فیلم‌های شناساگر، محلول‌های صمغ عربی و کربوکسی متیل سلولز با نسبت یک درصد در آب مقطر تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد توسط همزن مغناطیسی همزده شدند. به منظور افزایش انعطاف‌پذیری فیلم‌ها گلیسرول (۰/۳ گرم به یک گرم پلیمر) به محلول‌های پلیمری اضافه گردید. با توجه به نتایج پژوهش های پیشین برای تهیه فیلم‌های کامپوزیتی، محلول فیلم صمغ عربی و کربوکسی متیل سلولز تهیه شده با نسبت یک به یک به آرامی و در طی مدت زمان ۳۰ دقیقه مخلوط شدند. سپس، آنتوسیانین استخراج شده در سه غلظت ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر به محلول فیلم کامپوزیتی اضافه شد. در نهایت بعد از حباب زدایی توسط دستگاه وکیوم، محلول مورد نظر در پلیت‌های پلاستیکی به قطر ۸ سانتی‌متر ریخته شد و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. فیلم‌های شناساگر تهیه شده پس از جداسازی از پلیت‌ها تا استفاده‌های بعدی در کیسه‌های زیپ‌کیپ داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل نگهداری شدند (Rezaei et al., 2019).

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)

آزمون FTIR نمونه‌های فیلم توسط دستگاه Shimadzu مدل 8400S ساخت کشور ژاپن و در گستره cm^{-1} ۴۰۰–۴۰۰۰ با تفکیک پذیری cm^{-1} ۴ انجام شد (Jiang et al., 2020).

پراش پرتو ایکس (XRD)

آزمون پراش پرتو ایکس فیلم‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه X'Pert MPD ساخت کشور هلند با پرتویی با طول موج ۱/۷۸۹۰۱ آنگستروم و با تیوب کبالت در زاویه ۸۰–۶= 2θ درجه، در دمای محیط و با سرعت یک درجه در دقیقه صورت پذیرفت (Rezaei et al., 2019).

گرماسنجی افتراقی (DSC)

به‌منظور بررسی رفتار گرمایی فیلم‌ها از دستگاه DSC ساخت شرکت Malvern مدل ZEN3600 کشور انگلستان استفاده شد. حدود ۱۵ میلی‌گرم از فیلم‌های مختلف در درون دستگاه قرار داده شده و از دمای ۳۰ تا ۳۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. در حین آزمایش تغییرات دمایی ثابت و برابر ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بود.

نفوذپذیری به بخار آب (WVP)

خاصیت نفوذپذیری نمونه‌ها نسبت به بخار آب طبق روش شماره E96 بررسی شد (ASTM, 2002). در این آزمایش از سلول‌های نفوذپذیری با ابعاد ۳ سانتی‌متر قطر داخلی و ۳/۵ سانتی‌متر ارتفاع داخلی که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر بودند استفاده شد. فیلم‌ها بر سطح سلول‌های نفوذپذیری نصب گردید و در ادامه سل داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل به مدت ۸ ساعت قرار داده شد (Jahit et al., 2016). طی این زمان، وزن سلول‌ها توسط ترازوی دیجیتال ۰/۰۰۰۱ به‌طور متداول و هر دوساعت یک بار اندازه‌گیری شد. نرخ انتقال بخار آب با استفاده از رابطه ۱ اندازه‌گیری شد.

(۱) نرخ انتقال بخار آب= (شیب خطی)/(سطح سلول)

همچنین میزان نفوذپذیری به بخار آب از ضرب نمودن نرخ انتقال بخار آب در ضخامت فیلم‌ها و تقسیم آن در اختلاف فشار موجود در دو سمت فیلم به‌دست آمد و به‌صورت $g\ pas^{-1}\ m^{-1}\ s^{-1}$ گزارش شد.

زاویه تماس قطره آب (CA)

زاویه تماس فیلم‌های شناساگر تهیه شده به‌عنوان فاکتوری از میزان آب‌دوستی و آب‌گریزی مواد با استفاده از دستگاه Rycobel ساخت کشور سوئیس مورد بررسی قرار گرفت. حدود ۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و فاقد یون به‌وسیله میکروسرنگ بر سطح افقی فیلم در دمای ۲۲± ۵ درجه سانتی‌گراد با ۳ تکرار قرار گرفت و در نهایت میزان زاویه تماس در طول مدت زمان یک دقیقه اندازه‌گیری شد (Ghaderi et al., 2019).

خواص مکانیکی

ضخامت فیلم‌ها در پنج نقطه از هر تکرار توسط ریزسنج دیجیتالی ۰/۰۰۱ میلی‌متر (Mitutoyo، ژاپن) اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی خاصیت مکانیکی نمونه‌ها ابتدا فیلم‌ها در ابعاد (۱۰×۶۰ میلی‌متر) برش داده شد و آزمون کشش طبق استاندارد D882-09 مصوب ASTM انجام شد. سرعت کشش ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه و فاصله بین دو فک ۳ سانتی‌متر انتخاب شد. شاخص‌های مقاومت کششی (TS) (MPa) و درصد کرنش در نقطه شکست (EAB) (٪) (۱۰۰× طول اولیه/ تغییر طول اولیه) از روی منحنی‌های نیرو بر حسب تغییر شکل به دست آمدند (ASTM, 2002).

ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی

خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تهیه شده با استفاده از روش خنثی کنندگی رادیکال آزاد DPPH انجام شد. به این منظور ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره فیلم به ۵۰ میکرولیتر محلول DPPH اضافه شد، همچنین از محلول DPPH فاقد فیلم به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. پس از ۶۰ دقیقه نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، جذب نمونه‌های حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت

خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد (Jiang et al., 2020).

$$\text{مهار فعالیت رادیکال آزاد}\ (\%) = \frac{A_0 - A_S}{A_0} \times ۱۰۰ \qquad (۲)$$

در این فرمول A_0 و A_s به ترتیب نشان‌دهنده جذب نوری محلول شاهد (محلول DPPH) و شناساگر می‌باشند.

تغییرات رنگی فیلم‌های شناساگرها

به‌منظور ارزیابی تغییر رنگ فیلم‌های شناساگر تهیه شده در pHهای مختلف، ابتدا محلول‌هایی با pH ۲ تا ۱۳ با استفاده از HCl و NaOH تهیه گردید. در ادامه فیلم‌های شناساگر در ابعاد ۲× ۲ برش داده شده و به مدت ۲ دقیقه در معرض میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول های تهیه شده در pHهای مختلف (۲ تا ۱۳) قرار گرفت. سپس عکس-برداری از نمونه‌ها در شرایط یکسان انجام شد (Jiang et al., 2020).

تغییرات رنگی شناساگرهای تهیه شده نسبت به گاز آمونیاک

به‌منظور ارزیابی پاسخ رنگی فیلم‌های شناساگر به گاز آمونیاک، نمونه‌های فیلم تهیه شده در ابعاد ۲× ۲ برش داده شده و به دیواره ظرف سر پوشیده (بشر) چسبانده شد. سپس به میزان ۵ میلی‌لیتر آمونیاک به محیط نمونه وارد و پس از گذشت ۲ دقیقه، تغییرات رنگی به دست آمده ثبت گردید (Jiang et al., 2020; Bolin and Huxsoll., 1991).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ انجام شد. تمامی نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده است. جهت تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نقطه نظر شاخص‌های اندازه‌گیری شده، از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) در قالب آزمون دانکن و در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج و بحث

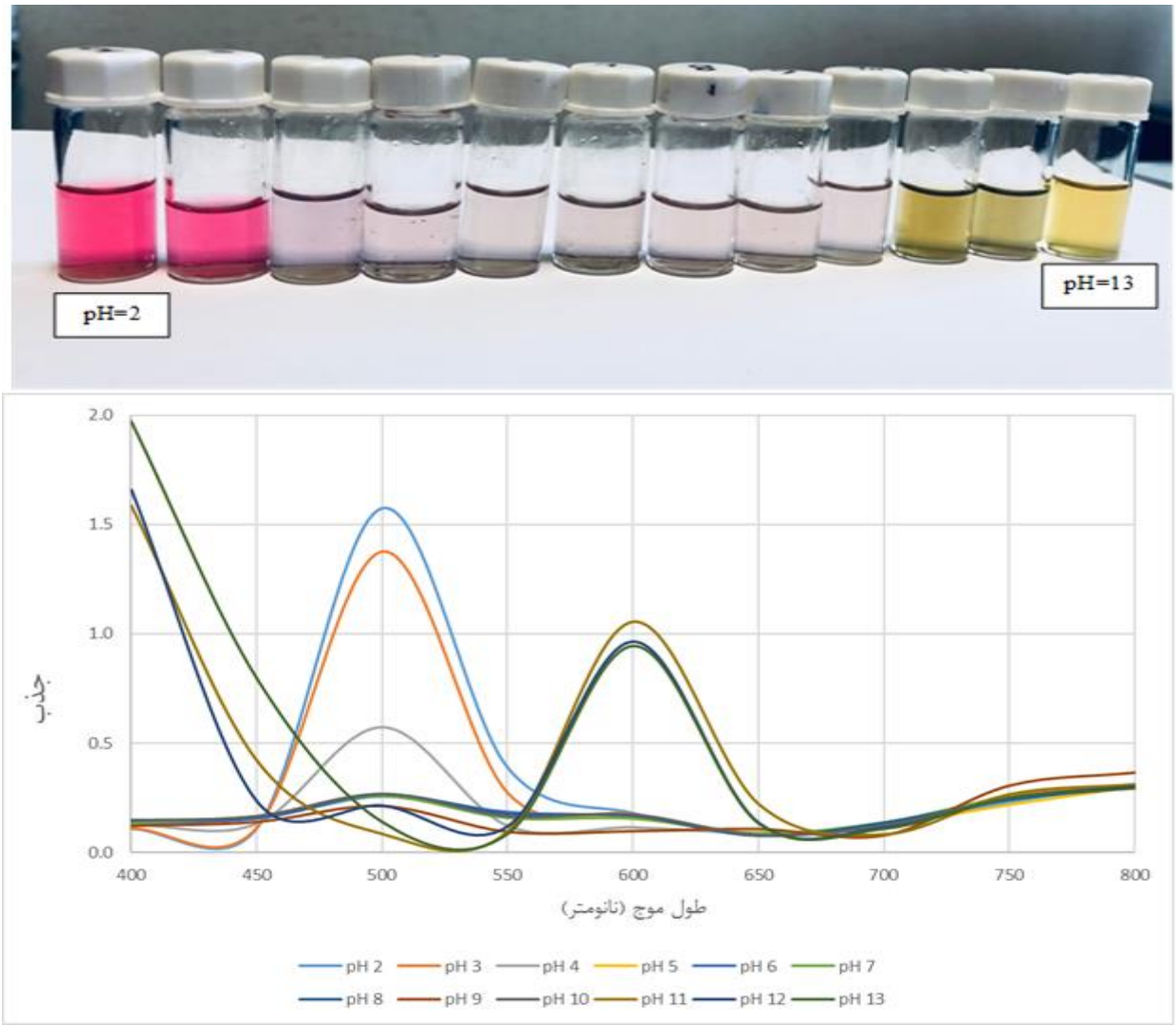
تغیرات رنگی آنتوسیانین استخراج شده در pHهای مختلف

در صنعت مواد غذایی آنتوسیانین‌ها به‌عنوان رنگدانه‌های طبیعی و محلول در آب به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Tsai et al., 2002). همانطور که ذکر شد گیاهان حاوی این ترکیبات به‌واسطه تغییر رنگ در pHهای مختلف می‌توانند به‌عنوان جز فعال در ماتریس زمینه ای بسته‌بندی‌های هوشمند مورد استفاده قرار گیرند. حساسیت آنتوسیانین استخراج شده در این تحقیق در pHهای ۲ تا ۱۳ مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱ (الف) مشاهده می‌شود در pHهای ۲ و ۳ رنگ محلول قرمز بود. در pHهای ۴ تا ۱۰ رنگ محلول به صورت بی‌رنگ تا صورتی کمرنگ مشاهده شد. در pHهای ۱۱ تا ۱۳ محلول به رنگ سبز کمرنگ تا زرد تغییر یافت. شکل ۱ (ب) تغییرات در میزان جذب نور محلول آنتوسیانین تحت تاثیر pHهای مختلف را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود میزان جذب در pHهای کمتر از ۹ بیشتر بود به‌طوری که بیشترین میزان جذب در pH برابر ۲ و طول موج حدود ۵۰۰ نانومتر مشاهده شد اما در این طول موج میزان جذب در pHهای قلیایی کمتر بود. در pHهای قلیایی (۱۱، ۱۲ و ۱۳) یک پیک جذب نسبتا قوی در طول موج حدود ۶۰۰ نانومتر مشاهده شد. تغییرات در میزان جذب نوری بیانگر حساسیت آنتوسیانین استخراج شده به pHهای متفاوت می‌باشد. علت تشکیل رنگ‌های حاصل و همچنین تفاوت در میزان جذب طیف‌ها مربوط به تغییر ساختار آنتوسیانین استخراج شده در pHهای مختلف می‌باشد.، که دلیل این تغییر ساختار، انتقال یون هیدروژن (H^+) است. به‌طوری که در اسیدیته بالا منجر به تشکیل فرم کاتیون فلاویلیوم می‌گردد که ترکیب تشکیل شده پایدار بوده و حاوی رنگ قرمز می‌باشد (Remon et al., 2000). اما در pH بالا ساختار آنتوسیانین تخریب شده و منجر به تشکیل رنگ سبز می‌شود (Grajeda-Iglesias et al., 2017). در این رابطه پیشتر آنتوسیانین از سیب‌زمینی شیرین بنفش (*Ipomoea batatas*) توسط Jiang و همکاران (۲۰۲۰) استخراج گردید و نتایج نشان داد که آنتوسیانین استخراج شده به قرارگیری در معرض pHهای مختلف حساس بوده و به صورت تغییر رنگ از قرمز تا آبی و سبز واکنش نشان می‌دهد (Jiang et al., 2020). همچنین، آنتوسیانین از گیاه بلوبری توسط Luchese و همکاران، (۲۰۱۷) استخراج شده است که در pH اسیدی رنگ متمایل به قرمز را نشان داده و با افزایش pH منتج به تغییر رنگ از قرمز به سبز گردید (Luchese et al., 2017).

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)

در بررسی طیف مادون قرمز، برهمکنش‌های بین مولکولی ترکیب‌ها و تغییرات در گروه‌های عاملی آن‌ها تحلیل می‌گردد. نتایج طیف‌سنجی فیلم‌های شناساگر حاوی آنتوسیانین ریحان بنفش در شکل ۲ نشان‌داده شده است. پیک‌های مشاهده شده در محدوده $۳۰۰۰\ cm^{-1}$ تا ۳۵۰۰ مرتبط با باندهای کششی گروه هیدروکسیل آزاد و باندهای کششی متقارن و نامتقارن N-H در گروه آمین می‌باشد که در تمامی تیمارها قابل مشاهده است (Ojagh et al., 2018). با افزایش غلظت آنتوسیانین تا ۸۰ میلی‌گرم از شدت پیک‌های تشکیل شده در این محدوده کاسته شد. همچنین، در تمامی تیمارها در محدوده $۱۰۰۰\ cm^{-1}$ تا ۲۰۰۰ پیک‌های متداولی قابل مشاهده بود که می‌تواند مرتبط با

پیوندهای ارتعاشی C=C (۱۵۹۳ cm^{-1}) و پیوندهای ارتعاشی N-H (۶۴۱ cm^{-1}) باشد (Jiang et al., 2020; Ma and Wang., 2011; Ojagh et al., 2018).



شکل ۱- بازه تغییرات رنگی و جذب محلول حاوی آنتوسیانین استخراج شده از ریحان بنفش در pHهای مختلف

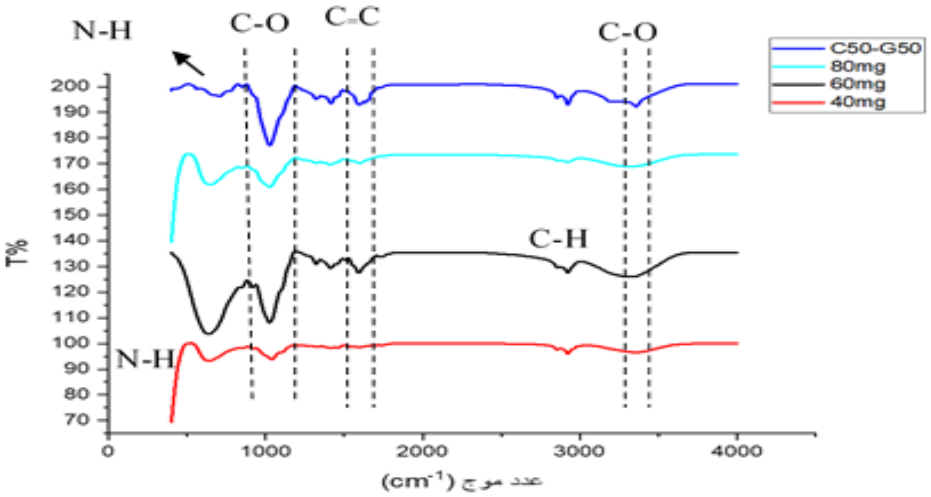
Fig. 1. Range of color changes and absorption of solution containing anthocyanin extracted from Violet Basil at different pH

این تغییرات جزئی در شدت و نواحی پیک‌های تشکیل شده می‌تواند نشان‌دهنده اختلاط مناسب آنتوسیانین در بستر فیلم‌ها باشد. اما جزئی بودن این تغییرات می‌تواند به مقدار کم آنتوسیانین استفاده شده در بستر فیلم‌ها نسبت داده شود. علت پیک‌های تشکیل شده را نیز می‌توان با ایجاد پیوند بین گروه هیدروکسیل صمغ عربی و کربوکسی متیل سلولز با گروه آمینی آنتوسیانین استخراج شده توجیه کرد (Xu et al., 2019). پیک‌های مشاهده شده در محدوده ۵۰۰ cm^{-1} تا ۶۰۰ می‌تواند مرتبط با وضعیت آنومری در فرم پیرانوزی قندها و همچنین گلیسرول استفاده شده در محلول فیلم شناساگرها باشد. در این رابطه، نتایج مشابهی در تحقیق Jiang و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده شد. مطابق با نتایج این پژوهش، با افزودن آنتوسیانین استخراج شده از کلم بنفش پیک‌های جدیدی در آزمون FTIR تشکیل شد، اما افزایش غلظت آنتوسیانین در بستر فیلم‌ها تفاوت چندانی در شدت پیک‌های تشکیل شده ایجاد نکرد (Jiang et al., 2020).

پراش پرتو ایکس (XRD)

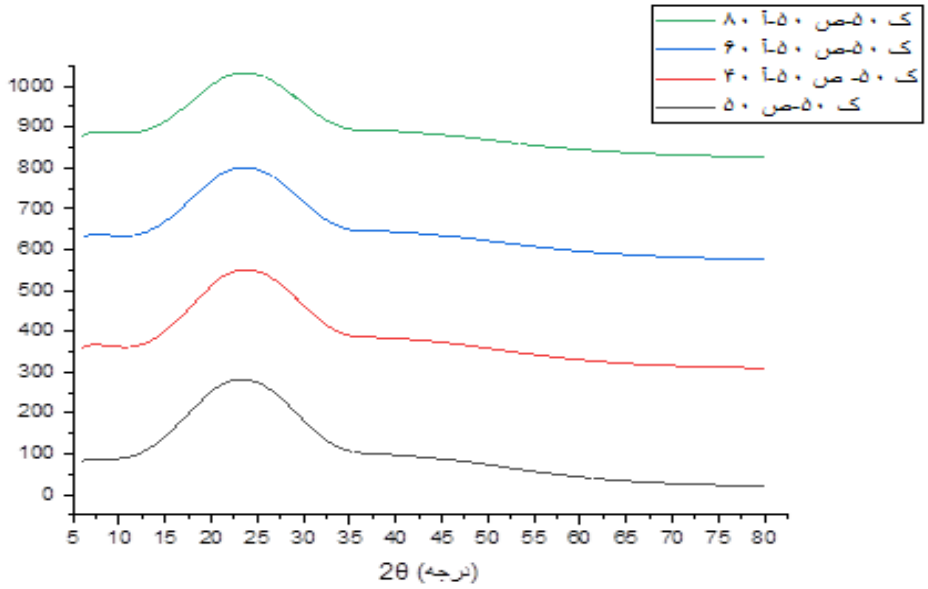
آزمون پراش پرتو ایکس (XRD) نشان‌دهنده ساختار کریستالی فیلم‌های تهیه شده و بی نظمی‌های ناشی از تشکیل پیوندهای عرضی

بین پلیمرها می‌باشد (Qi et al., 2009). نتایج حاصل از آزمون XRD در شکل ۳ نشان داده شده است. در نمونه‌های فیلم فاقد آنتوسیانین (نمونه شاهد) یک پیک در محدوده ۲۳/۱۱ مشاهده شد. با افزودن آنتوسیانین استخراج شده از ریحان بنفش در سه غلظت ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در بستر فیلم کامپوزیتی، زوایای پیک‌های تشکیل شده نسبت به فیلم های تیمار کنترل، تغییرات جزئی داشت که این پیک به ترتیب به درجات بالاتر ۲۳/۲۳، ۲۳/۳۱ و ۲۳/۳۲ انتقال یافت. دلیل این امر می‌تواند مربوط به اختلاط مناسب این ترکیبات و تغییر در پیوندهای تشکیل شده بین گروه‌های عاملی آن‌ها باشد (Huang et al., 2019; Jiang et al., 2020).



شکل ۲- الگوی طیف مادون قرمز (FTIR) فیلم‌های کنترل و فیلم‌های شناساگر حاوی غلظت‌های مختلف آنتوسیانین ریحان بنفش

Fig. 2. Infrared spectrum pattern (FTIR) of control films and detector films containing different concentrations of Violet Basil anthocyanin



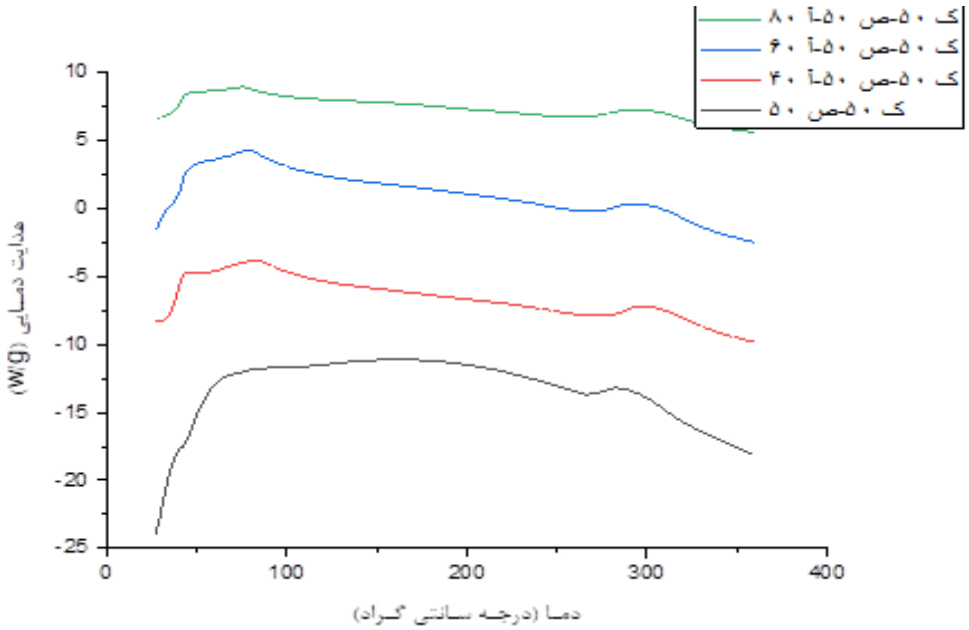
شکل ۳- الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) فیلم‌های کنترل و فیلم های شناساگر حاوی غلظت‌های مختلف آنتوسیانین ریحان بنفش

Fig. 3. X-ray diffraction pattern (XRD) of control films and detector films containing different concentrations of Violet Basil anthocyanins

گرماسنجی افتراقی (DSC)

امتزاج‌پذیری پلیمرها از عوامل مهم در بهبود ترکیبات نوین حاصل از ترکیب پلیمرها است که بر خواص نهایی آن‌ها تاثیر می‌گذارد (Kanimozhi et al., 2016). به این منظور، خواص حرارتی شناساگرهای تهیه شده (فیلم‌های کامپوزیت حاوی آنتوسیانین) مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق نتایج به دست آمده (شکل ۴)، با افزودن

آنتوسیانین در بستر فیلم کامپوزیتی (فیلم شاهد) دمای انتقال ذوب از ۲۶۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد به ۲۵۷/۳۸ درجه سانتی‌گراد در فیلم حاوی ۸۰ میلی‌گرم آنتوسیانین کاهش یافت. بر این اساس می‌توان عنوان کرد که افزودن آنتوسیانین منجر به کاهش مقاومت برهمکنش‌های شیمیایی و پیوندهای تشکیل شده در فیلم‌های کامپوزیتی حاوی آنتوسیانین گردیده است. این نتایج با نتایج خواص فیزیکی و مکانیکی که در ادامه به آن پرداخته خواهد شد مطابقت دارد. نتایج مشابهی در تحقیقات Ma و Wang (۲۰۱۶) در مطالعه شناساگرهای بر پایه صمغ تارا و سلولز حاوی آنتوسیانین پوسته انگور؛مشاهده شد (Ma and Wang., 2011). اما در نتایج تحقیقات Jiang و همکاران (۲۰۲۰) با افزایش میزان آنتوسیانین، مقاومت حرارتی افزایش یافت که دلیل این امر به بهبود قدرت و تعداد پیوندهای گروه‌های هیدروکسیل نسبت داده شده است (Jiang et al., 2020).



شکل ٤- الگوی مقاومت حرارتی (DSC) فیلم‌های کنترل و فیلم‌های شناساگر حاوی غلظت‌های مختلف آنتوسیانین ریحان بنفش

Fig. 4. Thermal resistance pattern (DSC) of control films and detector films containing different concentrations of Violet Basil anthocyanin

نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP)

با توجه به این که آب جزء عوامل مهم و تاثیرگذار در واکنش‌های مرتبط با فساد مواد غذایی شناخته شده است، نرخ انتقال بخار آب از مهم‌ترین ویژگی‌های مرتبط با پلیمرهای مورد استفاده در صنعت بسته بندی محسوب می‌شود (Jamshidian et al., 2012). به‌طوری که یکی از کاربردهای اصلی بسته‌بندی، حفظ ماده غذایی در برابر انتقال رطوبت است. میزان انتقال بخار آب در فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر به ماهیت آبدوستی یا آبگریزی، نحوه ساخت، میزان و نوع افزودنی‌های مورد استفاده بستگی دارد. بنابراین در تحقیق حاضر میزان نفوذپذیری فیلم‌های شناساگر تهیه شده بر اساس نرخ انتقال بخار آب نسبت به زمان اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد (جدول ۱) که با افزودن آنتوسیانین میزان نفوذپذیری به بخار آب به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). به‌طوری که این میزان از ۳/۰۰ ($g\ pas^{-1}\ m^{-1}\ s^{-1}$) در فیلم کامپوزیتی حاوی ۵۰ درصد از هر پلیمر (ک ۵۰: ص ۵۰) به ۴/۷۳ ($g\ pas^{-1}\ m^{-1}\ s^{-1}$) در فیلم شناساگر حاوی ۸۰ میلی‌گرم آنتوسیانین رسید. علت این امر می‌تواند مرتبط با کاهش فشردگی ساختاری و از بین رفتن یکپارچگی در سطح نمونه‌های تهیه شده باشد؛ زیرا نحوه قرارگیری و ترکیبات موجود در آنتوسیانین منجر به ایجاد تغییراتی در سطح ساختار مولکولی پلیمرها شده و لذا فشردگی نمونه‌های تهیه شده کاهش یافته است. در نتیجه این پدیده سبب تسریع عبور بخار آب از شناساگرها گردیده است (Jiang et al., 2020; Xu et al., 2019; Ma and Wang., 2016). همچنین با افزایش سطح آنتوسیانین در بستر فیلم‌ها میزان انتقال بخار آب به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($p<۰/۰۵$) که این امر را می‌توان مرتبط با تشکیل ترک و منافذ ناشی از افزایش غلظت آنتوسیانین مرتبط دانست. در این زمینه پیشتر Yong و همکاران (۲۰۱۹) بیان داشتند که با افزودن آنتوسیانین استخراج شده از سیب-زمینی شیرین در بستر فیلم کیتوزان، نرخ انتقال بخار آب افزایش یافت (Yong et al., 2019).

زاویه تماس قطره آب

زاویه تماس به‌عنوان شاخصی از میزان آبگریزی و آبدوستی سطحی اجسام و پلیمرها شناخته شده است (Ojagh et al., 2010). در واقع زاویه تشکیل شده از تقاطع دو خط مورب به سطح مایع و جامد در محل تماس با هوا به‌عنوان زاویه تماس در نظر گرفته می‌شود و می‌تواند به‌عنوان معیاری مناسب به‌منظور تعیین میزان آبدوستی در نظر گرفته شود. به این منظور در این تحقیق آزمون زاویه تماس انجام شد و نتایج حاصل در جدول ۱ خلاصه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزودن آنتوسیانین در بستر فیلم‌ها میزان زاویه تماس به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). به طوری که بیشترین میزان آن در تیمار فاقد آنتوسیانین مشاهده شد و برابر با ۶۶/۸۰ درجه بود. اما با افزایش سطح آنتوسیانین میزان زاویه تماس قطره با سطح نمونه به ۵۵/۳۳ درجه در تیمار حاوی ۸۰ میلی‌گرم آنتوسیانین کاهش یافت. از آنجا که کاهش میزان زاویه تماس نشان از افزایش آبدوستی نمونه می‌باشد، می‌توان بیان نمود که به دلیل حضور احتمالی ترکیبات آبدوست در آنتوسیانین استفاده شده در ماتریس فیلم تولیدی، زاویه تماس یا به عبارتی ضریب آب‌گریزی کاهش پیدا کرده است.

خواص مکانیکی

خواص مکانیکی از عوامل مهم و تاثیرگذار در پایداری بسته‌بندی در هنگام حمل و نقل است که به نحوه ساخت و برهمکنش بین پلیمرهای سازنده بستگی دارد (Sothornvit et al., 2005). با افزایش برهمکنش‌های مناسب و برقراری پیوندهای هیدروژنی بین ترکیبات خواص مکانیکی فیلم‌ها افزایش می‌یابد. در این پژوهش به‌منظور بررسی خواص مکانیکی نمونه‌ها، میزان مقاومت کششی (TS) و درصد افزایش طول در لحظه پارگی (EAB) آن‌ها اندازه‌گیری و نتایج بدست آمده در جدول ۱ نشان‌داده شده است. مطابق با نتایج میزان مقاومت کششی با افزودن آنتوسیانین در بستر فیلم‌ها در ابتدا به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$) و از ۱۹/۰۰ مگاپاسکال در فیلم شاهد (ک ۵۰: ص ۵۰) به ۲۳/۶۴ مگاپاسکال در نمونه حاوی ۶۰ میلی‌گرم آنتوسیانین (ک ۵۰: ص۵۰- آ ۶۰) رسید. این افزایش مقاومت ابتدایی ممکن است به دلیل تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های عاملی موجود در ترکیب صمغ عربی-کربوکسی متیل سلولز با آنتوسیانین اضافه شده باشد. این گونه اتصالات باعث می‌شود زنجیره‌های پلیمری به صورت محکم‌تری به یکدیگر متصل شوند و مقاومت کششی افزایش یابد. سپس با افزایش سطح آنتوسیانین تا ۸۰ میلی‌گرم مقاومت کششی شناساگر تهیه شده (ک ۵۰: ص ۵۰- آ ۸۰) به ۱۴/۱۱ مگاپاسکال کاهش یافت. این موضوع را چنین می‌توان توجیه کرد که افزایش غلظت آنتوسیانین در فیلم‌ها منجر به از بین رفتن ساختار یکپارچه آن‌ها شده و همچنین منتج به عدم ارتباط مناسب بین پلیمرها گردید.

جدول ۱- ویژگی فیزیکی (نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP) و زاویه تماس (CA)) و مکانیکی (مقاومت کششی (TS) و درصد افزایش طول (EAB)) شناساگرهای تهیه شده.

Table 1- Physical properties (water vapor permeability and contact angle) and mechanical properties (tensile strength and elongation at break) of prepared indicator.

نوع فیلم	نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP) ($g\ pas^{-1}\ m^{-1}\ s^{-1}$)	مقاومت کششی (TS) (MPa)	درصد افزایش طول (EAB) (٪)	زاویه تماس (CA) (°)
ک ۵۰:ص ۵۰ C50:G50	3± 0.09 c	19± 0.62 b	6.08± 0.72 a	66.80± 0.75 a
ک ۵۰:ص ۵۰-آ ٤۰ A40-C50:G50	3.57± 0.35 b	21.56± 3.76 a	2.49± 0.26 b	54.03± 3.95 c
ک ۵۰:ص ۵۰-آ ٦۰ A60-C50:G50	4.03± 0.18 b	23.64± 0.37 a	2.59± 0.11 b	56.62± 0.95 b
ک ۵۰:ص ۵۰-آ ۸۰ A80-C50:G50	4.73± 0.12 a	14.11± 1.52 c	1.56± 0.28 c	55.33± 0.57 b

حروف انگلیسی کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌دار بین هر تیمار را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$).

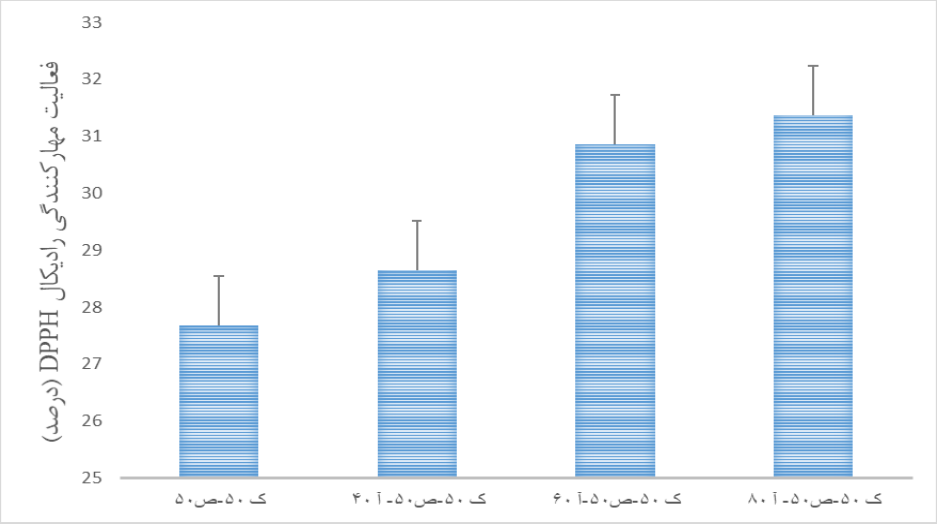
Different letters within a column indicate significant difference at $P < 0.05$.

Alizadeh و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی خواص مکانیکی فیلم شناساگر حاوی آنتوسیانین زرشک بیان داشتند که با افزودن آنتوسیانین در ماتریس فیلم میزان مقاومت کششی به طور معنی‌داری کاهش یافته است (Alizadeh et al., 2021). همچنین مطالعات Ma و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که اضافه کردن آنتوسیانین پوست انگور به فیلم کامپوزیت صمغ تارا- سلولز در ابتدا منجر به افزایش مقاومت کششی

تا ۵۶ مگاپاسکال گردید اما با افزایش سطح آنتوسیانین میزان آن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و به ۴۴ مگاپاسکال رسید که در واقع تایید کننده نتایج این تحقیق می‌باشد (Ma and Wang., 2016). در این مورد بیشترین میزان درصد افزایش طول در فیلم‌های کنترل مشاهده شد اما با اضافه کردن آنتوسیانین در بستر فیلم‌ها، درصد افزایش طول در لحظه پارگی کاهش یافت؛ به طوری که در تمام سطوح آنتوسیانین این کاهش معنی‌دار بوده است ($p<0/05$). در تحقیق صورت گرفته توسط Jiang و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده شد که بیشترین میزان درصد افزایش طول در لحظه پارگی مرتبط با نمونه شاهد می‌باشد و اضافه کردن آنتوسیانین تا غلظت ۰/۹ گرم منجر به کاهش حداکثر این پارامتر نسبت به سایر تیمارها گردید (Jiang et al., 2020).

خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

رادیکال آزاد DPPH یک ترکیب پایدار می‌باشد که بیشترین میزان جذب نوری را در طول موج ۵۱۷ نانومتر به نمایش می‌گذارد. این رادیکال در مطالعات گسترده‌ای که ترکیبات آن‌ها قادر به حذف رادیکال آزاد و یا دهنده هیدروژن می‌باشند، جهت سنجش ویژگی‌های مهارکنندگی رادیکال آزاد به‌عنوان یکی از آزمون‌های سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی نمونه‌های فیلم تهیه شده در تحقیق حاضر در شکل ۵ نشان داده شده است. در این آزمون تمامی نمونه‌ها دارای فعالیت آنتی-اکسیدانی بودند اما فیلم کامپوزیت کربوکسی متیل سلولز- صمغ عربی (ک۵۰: ص ۵۰) در مقایسه با تیمارهای حاوی شناساگر فعالیت آنتی-اکسیدانی کمتری را نشان داد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم شاهد می‌تواند به دلیل واکنش بین رادیکال‌های آزاد و گروه آمین آزاد باقی‌مانده از آمونیوم باشد (Moradi et al., 2012). با افزودن آنتوسیانین به بستر فیلم‌ها، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها افزایش یافت. بدین ترتیب کمترین و بیشترین درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به ترتیب در تیمار شاهد (۲۷/۵٪) و تیمار حاوی ۸۰ میلی‌گرم آنتوسیانین (۳۱/۴٪) مشاهده شد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که آنتوسیانین‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Ravanfar et al 2018). این خواص آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مرتبط با وجود گروه‌های فنولی در این ترکیبات باشد. در رابطه با ترکیات فنولی نیز، خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها عمدتا مرتبط با خاصیت احیاکنندگی آن‌ها می‌باشد که می‌تواند نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد داشته باشد (Ravanfar et al., 2018). بنابراین خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها را می‌توان به وجود ترکیبات فنولی در هر دو ترکیب صمغ عربی و آنتوسیانین استخراج شده نسبت داد.



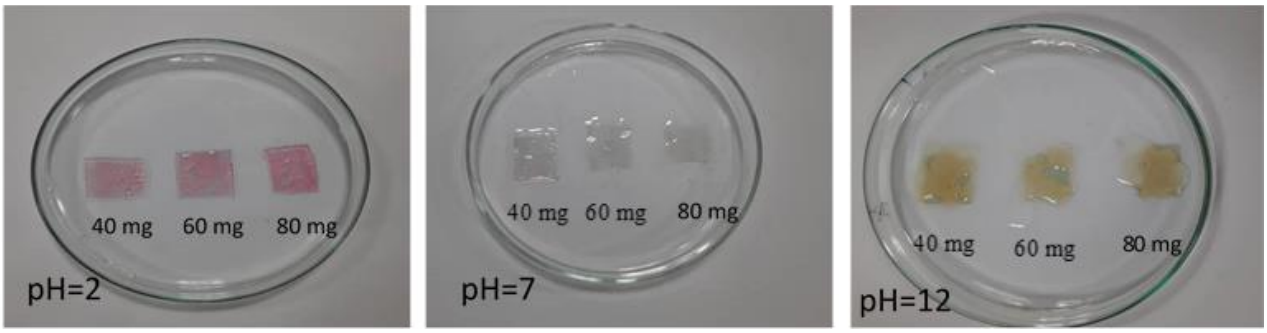
شکل ۵- خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

Fig. 5. DPPH radical scavenging activity

پاسخ رنگی فیلم‌های شناساگر تهیه شده در pHهای مختلف

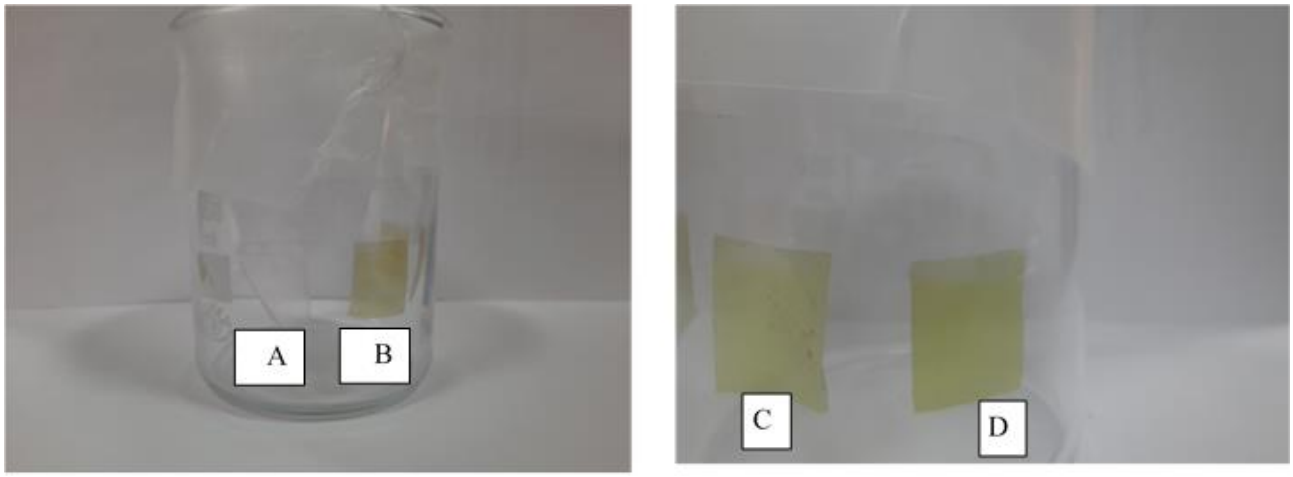
آزمون تغییرات رنگی شناساگرها در نمونه‌های حاوی آنتوسیانین در pHهای مختلف (۱۳- ۲) مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود در اسیدیته بالا نمونه‌ها دارای رنگ قرمز تا ارغوانی بودند اما با افزایش pH تا حد خنثی، نمونه‌ها بی‌رنگ شدند. همچنین با افزایش مجدد pH تا میزان حداکثر (pH قلیایی)، رنگ سطحی نمونه‌های فیلم شناساگر به زرد تغییر یافت. نتایج رنگ فیلم

های تهیه شده در pHهای مختلف با رنگ محلول‌های حاوی آنتوسیانین ریحان بنفش توضیح داده شده در بخش قبل تطابق داشت. همانطور که گفته شد علت این تغییرات رنگ مرتبط با تغییر ساختار آنتوسیانین استخراج شده در pHهای مختلف می‌باشد که در محیط اسیدی رنگ قرمز تا ارغوانی و در محیط‌های قلیایی رنگ سبز تا زرد را تشکیل می‌دهند (Remon et al., 2000). لذا با اضافه کردن این ترکیب در بستر فیلم کامپوزیت صمغ عربی-کربوکسی متیل سلولز خاصیت شناساگری در آن‌ها القا شده و با قرارگیری در pHهای مختلف به‌واسطه وجود این ترکیبات رنگ شناساگرها تغییر یافت. مشاهدات صورت گرفته توسط سایر محققان نیز اثبات کرده است که اضافه کردن آنتوسیانین در بستر فیلم‌های پلیمری باعث ایجاد حساسیت آن‌ها نسبت به pH می‌شود (Ezati and Rhim., 2020; Choi et al., 2017). علاوه بر این، مطالعات Yong و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان داد که فیلم شناساگر تهیه شده از کیتوزان حاوی آنتوسیانین سیب‌زمینی شیرین بنفش می‌تواند قابلیت تغییر رنگ در pHهای مختلف را داشته باشد، به طوری که در pH اسیدی دارای رنگ قرمز و با افزایش pH رنگ سبز مشاهده شود (Yong et al., 2019).



شکل ٦- پاسخ رنگی شناساگرهای تهیه شده از صمغ عربی- کربوکسی متیل سلولز حاوی غلظت‌های مختلف آنتوسیانین ریحان بنفش نسبت به pHهای متفاوت

Fig. 6. The color response of indicators prepared from gum Arabic -Carboxymethyl cellulose containing different concentrations of Violet Basil anthocyanin to different Ph



شکل ۷- پاسخ رنگی شناساگرهای تهیه شده از غلظت‌های مختلف آنتوسیانین ریحان بنفش (۰، ٤٠، ٦٠ و ٨٠ میلی‌گرم) نسبت به گاز آمونیاک.
A= تیمار شاهد، B= ٤٠ میلی‌گرم آنتوسیانین، C= ٦٠ میلی‌گرم آنتوسیانین، D= ٨٠ میلی‌گرم آنتوسیانین

Fig. 7. The color response of the indicators prepared from different concentrations of Violet Basil anthocyanin (0, 40, 60 and 80 mg) to ammonia gas. A= Control treatment, B= 40 mg Anthocyanin, C= 60 mg Anthocyanin, D= 80 mg Anthocyanin,

پاسخ رنگی شناساگرهای تهیه شده نسبت به گاز آمونیاک

به‌منظور شبیه‌سازی گاز آمونیاک حاصل از فساد ماهی، بررسی تغییرات رنگی شناساگرهای تهیه شده تحت تاثیر گاز آمونیاک مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۷). همانطور که مشاهده می‌شود شناساگرهای تهیه شده نسبت به گاز آمونیاک به صورت تغییرات رنگی واکنش نشان داده و رنگ شناساگرها به رنگ زرد تغییر یافت. مکانیسم این تغییر رنگ به این صورت می‌باشد که ابتدا آمونیاک فرار با مولکول های آب موجود در شناساگرها واکنش داده و کمپلکس آمونیاک-آب را

تشکیل می‌دهند که سپس به فرم‌های NH^{+4} و OH^- هیدرولیز می‌شود. این تغییرات در میزان OH^- منجر به تغییر pH شده و در نهایت تغییرات رنگی در سطح شناساگرها را به همراه دارد (Jiang et al., 2012). در این مورد فیلم شاخص pH بر پایه متیل سلولز- کیتوزان حاوی آنتوسیانین زرشک (*Berberries*) توسط Alizadeh-sani و همکاران (۲۰۲۱) تهیه گردید. نتایج نشان داد که با قرارگیری فیلم شناساگر در معرض بخار آمونیاک رنگ سطحی به زرد تا سبز تغییر می‌یابد (Alizadeh et al., 2021). همچنین نتایج مشابهی در مطالعات Liu و همکاران (۲۰۲۱) در فیلم کامپوزیت پلی‌ونیل الکل-کربوکسی متیل سلولز حاوی آنتوسیانین کلم قرمز مشاهده شده است. این محققان دریافتند شناساگرهای تهیه شده از حساسیت بالایی نسبت به گاز آمونیک برخوردار هستند (Liu et al., 2021).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، ابتدا آنتوسیانین از ریحان بنفش استخراج و واکنش رنگی محلول آن نسبت به pHهای مختلف و گاز آمونیاک بررسی گردید. سپس فیلم شناساگر حساس به pH بر پایه فیلم کامپوزیت صمغ عربی-کربوکسی متیل سلولز حاوی آنتوسیانین ریحان بنفش تهیه و خصوصیات مختلف آن بررسی شد. نتایج آزمون‌های DSC و FTIR نشان‌داد که آنتوسیانین به موجب فعل و انفعالاتی بین محلول فیلم و آنتوسیانین با موفقیت در بستر فیلم مورد نظر امتزاج یافته است. افزودن آنتوسیانین به فیلم‌های شناساگر منجر به کاهش مقاومت کششی، درصد افزایش طول و زاویه تماس گردید. همچنین میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب با اضافه کردن سطح آنتوسیانین افزایش یافت. علاوه براین سنجش خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نشان‌داد که تمامی نمونه‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و با افزایش غلظت آنتوسیانین این شاخص افزایش یافت. حساسیت شناساگرهای تهیه شده نسبت به گاز آمونیاک و pH نیز بررسی شد و نتایج حاکی از آن بود که، با اضافه کردن آنتوسیانین ریحان بنفش در بستر فیلم زیستی، قابلیت تغییر رنگ در آن‌ها به وجود آمده و از رنگ قرمز (pH اسیدی) تا رنگ زرد (pH قلیایی) متغییر هستند. به این ترتیب فیلم تهیه شده می‌تواند به‌عنوان شناساگر غیرسمی، زیست تخریب‌پذیر و سازگار با محیط زیست در داخل بسته‌بندی هوشمند به‌منظور ارزیابی فساد مواد غذایی به‌ویژه محصولات شیلاتی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Alizadeh-Sani, M., Tavassoli, M., Mohammadian, E., Ehsani, A., Khaniki, G. J., Priyadarshi, R., & Rhim, J. W. (2021). pH-responsive color indicator films based on methylcellulose/chitosan nanofiber and barberry anthocyanins for real-time monitoring of meat freshness. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 741-750. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.231
2. Amalraj, A., Haponiuk, J. T., Thomas, S., & Gopi, S. (2020). Preparation, characterization and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol/gum arabic/chitosan composite films incorporated with black pepper essential oil and ginger essential oil. *International journal of biological macromolecules*, 151, 366-375. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.176
3. ASTM (2002). Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Annual Book of ASTM Standards. Designation D882-02. Philadelphia: American Society for Testing Materials.
4. Bolin, H. R., & Huxsoll, C. C. (1991). Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce. *Journal of Food Science*, 56(1), 60-62. 10.1111/j.1365-2621.1991.tb07975.x
5. Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001
6. Chen, H. Z., Zhang, M., Bhandari, B., & Yang, C. H. (2020). Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish freshness. *Food Hydrocolloids*, 100, 105438. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105438
7. Chen, S., Wu, M., Lu, P., Gao, L., Yan, S., & Wang, S. (2020). Development of pH indicator and antimicrobial cellulose nanofibre packaging film based on purple sweet potato anthocyanin and oregano essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 271-280. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.231
8. Choi, I., Lee, J. Y., Lacroix, M., & Han, J. (2017). Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. *Food Chemistry*, 218, 122-128. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.050
9. Chun, J., & Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), 316-324. https://doi.org/10.1099/ijs.0.054171-0
10. Close, D. C., & Beadle, C. L. (2003). The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69(2), 149-161. https://doi.org/10.1663/0006-8101(2003)069[0149:TEOFA]2.0.CO;2

11. Ezati, P., & Rhim, J. W. (2020). pH-responsive chitosan-based film incorporated with alizarin for intelligent packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 102, 105629. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105629
12. Ghaderi, J., Hosseini, S. F., Keyvani, N., & Gómez-Guillén, M. C. (2019) Polymer blending effects on the physicochemical and structural features of the chitosan/poly (vinyl alcohol)/fish gelatin ternary biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 95, 122-132. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.021
13. Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., & Oromiehie, A. (2011). pHysical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from Kefiran. *Carbohydrate Polymers*: 84(1), 477-483. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.010
14. Golasz, L. B., Silva, J. D., & Silva, S. B. D. (2013). Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration. Food Science and Technology, 33, 155-162. https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500023
15. Grajeda-Iglesias, C., Salas, E., Barouh, N., Baréa, B., & Figueroa-Espinoza, M. C. (2017). Lipophilization and MS characterization of the main anthocyanins purified from hibiscus flowers. *Food Chemistry*, 230, 189-194. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.140
16. Huang, S., Xiong, Y., Zou, Y., Dong, Q., Ding, F., Liu, X., & Li, H. (2019). A novel colorimetric indicator based on agar incorporated with *Arnebia euchroma* root extracts for monitoring fish freshness. *Food Hydrocolloids*, 90, 198-205. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.009
17. Inyoung Choi., Jun Young Lee., Monique Lacroix., & Jaejoon Han. (2017). Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. *Food Chemistry*. 218: 122-128. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.050
18. Jahit, I. S., Nazmi, N. N. M., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2016). Preparation and physical properties of gelatin/CMC/chitosan composite films as affected by drying temperature. *International Food Research Journal*, *23*(3).
19. Jamshidian, M., Tehrany, E.A., Imran, M., Akhtar, M.J., Cleymand, F., Desobry, S. (2012). Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. *Journal of food Engineering*, 110 (3): 380-389. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.034
20. Jiang, G., Hou, X., Zeng, X., Zhang, C., Wu, H., Shen, G., Zhang, Z. (2020). Preparation and characterization of indicator films from carboxymethyl-cellulose/starch and purple sweet potato (Ipomoea batatas (L.) lam) anthocyanins for monitoring fish freshness. *International journal of biological macromolecules*, 143, 359-372. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.024
21. Jiang, X., Jiang, T., Gan, L., Zhang, X., Dai, H., Zhang, X. (2012). The plasticizing mechanism and effect of calcium chloride on starch/ poly (vinyl alcohol) films, Carbohydr Polym. 90(4) 1677-1684. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.050
22. Kanimozhi, K., Basha, S. K., & Kumari, V. S. (2016). Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering*: C, 61, 484-491. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.084
23. Kerry, J. and Butler, P., (2008). Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods: Wiley Online Library, 681-689p.
24. Kuswandi, B., Larasati, T.S., Abdullah, A. and Heng, L.Y., (2012a). Real-Time Monitoring of Shrimp Spoilage Using on-Package Sticker Sensor Based on Natural Dye of Curcumin. *Food Analytical Methods*, 5(4): 881-889. https://doi.org/10.1007/s12161-011-9326-x
25. Liang, T., Sun, G., Cao, L., Li, J., & Wang, L. (2019). A pH and NH3 sensing intelligent film based on Artemisia sphaerocephala Krasch. gum and red cabbage anthocyanins anchored by carboxymethyl cellulose sodium added as a host complex. *Food Hydrocolloids*, 87, 858-868. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.028
26. Liu, D., Cui, Z., Shang, M., & Zhong, Y. (2021). A colorimetric film based on polyvinyl alcohol/sodium carboxymethyl cellulose incorporated with red cabbage anthocyanin for monitoring pork freshness. *Food Packaging and Shelf Life*, 28, 100641. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100641
27. Luchese, C. L., Sperotto, N., Spada, J. C., & Tessaro, I. C. (2017). Effect of blueberry agro-industrial waste addition to corn starch-based films for the production of a pH-indicator film. *International journal of biological macromolecules*, 104, 11-18. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.149
28. Ma, Q., & Wang, L. (2016). Preparation of a visual pH-sensing film based on tara gum incorporating cellulose and extracts from grape skins. Sensors and Actuators B: *Chemical*, 235, 401-407. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.107
29. Mariniello, L., Di Pierro, P., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P., & Porta, R. (2003). Preparation and mechanical properties of edible pectin–soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 102(2), 191-198. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00025-7

30. Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., & Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. LWT-*Food Science and Technology*, 46(2), 477-484. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.020
31. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161-166. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033
32. Ojagh, S.M., Shariatmadari, F., Adeli, A., Kordjozi, M., & Abdolahi, M. (2018). Development composite films based chitosan-Katira and evaluation physical and mechanical properties. *Innovative Food Technologies*. 4, 151-161. (In Persian)
33. Pereira, V.A., de Arruda, I.N.Q. and Stefani, R., (2015). Active Chitosan/PVA Films with Anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time–Temperature Indicators for Application in Intelligent Food Packaging. *Food Hydrocolloids*, 43(2): 180-188. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.014
34. Qi, H., Cai, J., Zhang, L., & Kuga, S. (2009). Properties of films composed of cellulose nanowhiskers and a cellulose matrix regenerated from alkali/urea solution. *Biomacromolecules*, 10(6), 1597-1602.
35. Rajaie, A., Shokrchizadeh, H. (2018). Investigation of physical and mechanical properties of edible film prepared from opopanax gum (*Commiphora guidottii*). 16 (91), 323-335. (In Persian).
36. Ravanfar, R. Moein, M.R. Niakousari, M. and Tamaddon, A.M. (2018) Extraction and fractionation of anthocyanins from red cabbage: ultrasonic-assisted extraction and conventional percolation method. *Journal of Food Measurement and Characterization* 12:2271–2277. https://doi.org/10.1007/s11694-018-9844-y
37. Remon, S., Ferrer, A., Marquina, P., Burgos, J., Oria, R., (2000). Use of modified atmospheres to prolong the postharvest life of Burlat cherries at two different degrees of ripeness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(10,) 1545 – 1552. https://doi.org/10.1002/1097-0010(200008)80:10<1545::AID-JSFA680>3.0.CO;2-X
38. Rezaei, A., Rezaei, M., Alboofetileh, M. (2021). Preparation of biodegradable carboxymethyl cellulose-Arabic gum composite film and evaluation of the physical, mechanical and thermal properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 17 (2). 287-297. (In Persian).
39. Sajjadi, S. E. (2006). Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. DARU *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 128-130.
40. Sothornvit, R., Krochta, J.M. (2005). Plasticizers in edible films and coating. In innovations in food packaging. 403-433. https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50055-3
41. Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S.W. (2003). Active packaging technologies with emphasis on antimicrobial packaging and its applications, *Journal of Food Science*, 68: 408-420. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05687.x
42. Tilebeni, H. G. (2011). Review to basil medicinal plant. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 2(1), 5-9.
43. Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B., & Jordan, B. R. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. Food research international, 35(4), 351-356. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00129-6
44. Xu, T., Gao, C., Yang, Y., Shen, X., Huang, M., Liu, S., & Tang, X. (2018). Retention and release properties of cinnamon essential oil in antimicrobial films based on chitosan and gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 84, 84-92. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.003
45. Yong, H., Wang, X., Bai, R., Miao, Z., Zhang, X., & Liu, J. (2019). Development of antioxidant and intelligent pH-sensing packaging films by incorporating purple-fleshed sweet potato extract into chitosan matrix. *Food hydrocolloids*, 90, 216-224. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.015
46. Yoshida, C. M., Maciel, V. B. V., Mendonça, M. E. D., & Franco, T. T. (2014). Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. LWT-food science and technology, 55(1), 83-89. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.015
47. Zhang, X., Lu, S., & Chen, X. (2014). A visual pH sensing film using natural dyes from Bauhinia blakeana Dunn. Sensors and actuators B: *Chemical*, 198, 268-273. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.094

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 543- 559

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۵۹-۵۴۳

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

Full Research Paper

Development of an analytical approach for determination of acrylamide content in roasted date seed varieties

Paniz Khaloo Kermani[1], Marzieh Moeenfard*[2], Reza Farhoosh[3], Arminda Alves[4]

Received: 2021.07.24
Revised: 2021.08.23
Accepted: 2021.09.07
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Khaloo Kermani, P., Moeenfard, M., Farhoosh, R., Alves, A. (2022). Development of an analytical approach for determination of acrylamide content in roasted date seed varieties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 543-559.

Abstract

Introduction: Date seed are considered as a valuable by-product from *Phoenix dactylifera L*. which played an important role in the economy and social life of the people of the Middle East and North Africa region. They consist mostly of carbohydrates, fatty acids and proteins as well as phenolic compounds. Despite the presence of various beneficial bioactive compounds, they are usually discarded or are utilized as animal fodder. Therefore, explore the effective methods to incorporate date seeds in the human diet is a great of interest. Roasting provides a low cost and easy approach to add value to these wastes as roasted date seed powder is being used in the Arabian region to make "date seed coffee". However, along with color and aroma changes, carcinogenic substance such as acrylamide may also formed during the roasting process. To date, no data have been published on the analysis of acrylamide in the roasted date seeds and respective brews. Therefore, the objective of the present study was development of an analytical method for determination of acrylamide in various date seeds varieties and their respective moka brews for the first time. Besides, other parameters related to the roasting process such as the color parameters and melanoidins content were also determined and compared with values obtained from Arabica coffee.

Materials and methods: For this purpose 5 different varieties of roasted date seeds including Shahani, Zahedi, Kabkab, Mazafati and Estamaran as well as Arabica coffee were used for coffee brewing. For acrylamide determination in solid samples, they were firstly extracted using hot deionized water. Afterwards, 5 mL of sample (extract or coffee brew) was placed in a 15 mL falcon and extraction solvents including acetonitrile (10 mL), hexane (5 mL) along with 1 g of NaCl and 4 g of $MgSO_4$ were added. After mixing on vortex for 1 min and centrifugation (5 min, 5000 rpm), 2 mL of the supernatant was cleaned using appropriate combination of sorbents (100 mg PSA, 50 mg C18 and 50 mg SAX) along with 0.30 g of $MgSO_4$.The cleaned supernatant was filtered and analyzed using high-performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector (HPLC-PDA) at 202 nm. The injection volume was 20 µL. The chromatographic separations were performed on a Eurospher 100-5 C18 column (250× 4.6 mm). Optimization was performed according to the type of organic solvent (acetonitrile and methanol), the percentage of organic solvent in the mobile phase (10, 5, 3% v/v) and the flow rate (0.1, 0.7, 0.5 mL/min). The color parameters (using photography and help of ImageJ software) and melanoidin content (spectrophotometrically at 420 nm) were also determined.

Results and discussion: The results indicated that the water/acetonitrile with a ratio of 97:3 and a flow rate of 0.7 mL/min permitted the acceptable separation of the acrylamide peak from the interfering compounds. The LOD and LOQ of optimized analytical method were 9.1 and 30.62 µg/kg, respectively. The suggested HPLC/PDA method is promising

1, 2 and 3. MSc Student, Assistant Professor, Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
4. LEPABE - Faculty of Engineering of University of Porto.
(*Corresponding Author Email: moeenfard@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71556.1072

for analysis in order to guarantee the quality control of acrylamide. The presence of acrylamide in all roasted date seeds was observed. Accordingly, acrylamide content in Arabica coffee (1825.23± 17.44 µg/kg) was significantly higher than those obtained from date seeds varieties. The amount of acrylamide in different types of date seeds varied from 360.99± 4.15 to 129.43± 2.37 µg/kg, being Kabkab and Mazafati as the highest and lowest values, respectively. Moka brews prepared from roasted date seeds demonstrated the presence of acrylamide in the range of 25-68 µg/L. The highest level of melanoidin were observed in Arabica coffee followed by Shahani, Zahedi, Kabkab, Mazafati and Estamaran, respectively. In the most cases, an inverse relationship was observed between the acrylamide and melanoidin content in roasted date seeds. For example, Shahani had low acrylamide and high melanoidin content. The study of color parameters revealed that the parameters *a** and *b** largely follow the pattern of melanoidin, so with increasing the amount of *a** and *b**, the amount of melanoidin also increased in the samples.

Keywords: Acrylamide, Arabica coffee, Roasting process, Melanoidins.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 543- 559

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۵۹-۵۴۳

مقاله علمی-پژوهشی

توسعه یک روش آنالیز جهت تعیین محتوای آکریل‌آمید در واریته‌های هسته خرمای برشته

پانیذ خالوکرمانی[۱]- مرضیه معین‌فرد[۲*]- رضا فرهوش[۳]- آرمیندا آلوش[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶

چکیده

آکریل‌آمید از جمله ترکیبات نامطلوب است که طی برشته کردن هسته خرما تولید می‌شود. با توجه به مضرات احتمالی آکریل‌آمید بر سلامت مصرف‌کنندگان، تعیین مقدار آن توسط HPLC-PDA در پودر و نوشیدنی موکا حاصل از پنج نوع واریته هسته خرما برشته شده در مقایسه با قهوه عربیکا برای اولین بار در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت. روش آنالیز به جهت نوع حلال آلی (استونیتریل و متانول)، درصد حلال آلی (۱۰، ۵، ۳ درصد حجمی/ حجمی) و سرعت جریان (۱/۰، ۰/۷، ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه) بهینه شد. همچنین پارامترهای رنگی و میزان ملانوئیدین انواع نوشیدنی هسته خرمای برشته در مقایسه با نوشیدنی قهوه عربیکا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ترکیب آب/استونیتریل با نسبت ۳:۹۷ و سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه، شرایط بهینه را جهت جداسازی پیک آکریل آمید فراهم می‌آورد. محتوای آکریل‌آمید پودر هسته خرمای کبکاب، استعمران، زاهدی، شاهانی و مضافتی به‌ترتیب ۴/۱۵ ±۳۶۰/۹۹، ۵/۹۸ ±۳۰۱/۰۷، ۹۷/۷۱ ±۲۹۲/۴، ۵۵/۲۵ ±۱۶۷/۳ و ۲/۳۷ ±۱۲۹/۴۳ میکروگرم بر کیلوگرم به‌دست آمد که به‌طور معنی‌داری کمتر از قهوه عربیکا (۱۷/۴۴ ±۱۸۲۵/۲۳ میکروگرم بر کیلوگرم) بود. نوشیدنی موکای حاصل از هسته خرمای برشته نیز حاوی ۶۸ -۲۵ میکروگرم بر لیتر آکریل‌آمید بود. میزان ملانوئیدین در محدوده ۱۱/۸۱ -۲/۸۰ گرم در ۱۰۰ گرم به‌دست آمد که بیشترین و کمترین مقدار به‌ترتیب در قهوه عربیکا و هسته خرمای استعمران گزارش شدند. همچنین بررسی پارامترهای رنگی نشان داد پارامترهای a^* و b^* تا حدی زیادی از الگوی ملانوئیدین پیروی می‌کنند، به‌طوری‌که با افزایش میزان a^* و b^*، میزان ملانوئیدین هم در نمونه‌ها افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: آکریل‌آمید، هسته خرما، قهوه عربیکا، برشته کردن، ملانوئیدین

مقدمه

خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera L.*، یکی از محصولات مهم و شناخته شده کشاورزی در سراسر جهان، به‌ویژه خاورمیانه و شمال آفریقا است که از دوران باستان در رژیم غذایی انسان وجود داشته است. درحالیکه میوه خرما به دلیل ارزش غذایی بالا در قالب محصولات قنادی متنوع به بازار عرضه می‌گردد، هسته خرما که تقریبا ۱۰ تا ۱۵ درصد از وزن میوه را شامل می‌شود، از ضایعات این صنعت به شمار رفته و غالبا در ریخته می‌شود (Bijami et al. 2020, Hilary et al. 2020).

طبق آمار سازمان جهانی خوار و بار و کشاورزی (FAO[۴]) تولید جهانی خرما در سال ۲۰۱۹، در حدود ۹ میلیون تن برآورد شده که از این میان مصر، عربستان سعودی و ایران به‌ترتیب با ۱۷، ۱۶ و ۱۴ درصد، بزرگترین تولیدکنندگان خرمای جهان به‌شمار می‌روند. با توجه به این آمار و متوسط وزن هسته خرما، تخمین زده می‌شود که در سال ۲۰۱۹ حدوداً ۱/۵ میلیون تن هسته خرما به‌عنوان ضایعات بخش‌های مختلف (اعم از تازه خوری یا ضایعات حاصل از صنایع فرآوری) تولید شده باشد (FAO 2019). هسته خرما یا به‌عنوان مکمل در خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرد و یا به‌طورکلی دور ریخته می‌شود که این امر منجر به آلودگی محیط زیست می‌گردد (Al-Farsi Mohamed Ali and Lee 2008). بسته به نوع میوه خرما، بر اساس درصد وزنی/وزنی هسته خرما حاوی ۳-۵ درصد رطوبت، ۵/۵- ۲/۵۹ درصد پروتئین، ۵/۹۲ -۵/۰۲ درصد روغن، حدود ۸۶- ۸۴ درصد کربوهیدارت و ۱/۱۶- ۰/۸۹ درصد خاکستر است (Al-Farsi Mohamed et al. 2007). لازم به ذکر است که مقادیر بالاتر روغن (۸/۶ درصد) و پروتئین

۱، ۲ و۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- استاد، دانشکده مهندسی دانشگاه پورتو.

* - نویسنده مسئول: Email: moeenfard@um.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71556.1072
4 Food and Agriculture Organization (FAO)

(۱۱/۰۹ درصد) نیز در برخی منابع گزارش شده است (Babiker et al. 2020). به‌علاوه، هسته خرما مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی (۳۱۰۲ تا ۴۴۳۰ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر ۱۰۰ گرم وزن خشک هسته خرما) و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی (۵۸۰ تا ۹۲۹ میکرومول ترولوکس بر ۱۰۰ گرم وزن خشک هسته خرما) را شامل می‌شود که به‌واسطه آن مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Maqsood et al. 2020). از تاثیرات مثبت هسته خرما بر سلامت می‌توان به خواص ضدالتهابی (Bouhlali et al. 2020)، ضددیابتی و ضدسرطانی (Habib et al. 2014) آن اشاره کرد. بنابراین با توجه به خواص سلامتی‌زایی هسته خرما و با در نظر گرفتن این موضوع که هسته خرما از ضایعات صنعت فرآوری خرما به‌دست می‌آید، عدم استفاده از این منبع سرشار از مواد مغذی، به لحاظ اقتصادی نیز توجیه پذیر نیست.

برشته کردن هسته خرما منجر به تولید ترکیبات آروماتیک مانند انواع الکل‌ها و آلدهیدها می‌شود که مشابه آن‌ها در دانه قهوه نیز وجود دارد و برای کسانی که می‌خواهند بدون دریافت مقادیر بالای کافئین، از طعم و رایحه‌ی قهوه لذت ببرند، مناسب است. بدین منظور، مردم در کشورهای عربی مانند عربستان سعودی و امارات، از پودر هسته خرمای برشته جهت تهیه نوشیدنی جایگزین قهوه استفاده می‌کنند. مصرف این نوشیدنی از اثرات منفی قهوه بر سلامتی مانند افزایش فشار خون، بی خوابی، سوء هاضمه و اضطراب ناشی از مقادیر بالای کافئین، جلوگیری می‌کند (Fikry Mohammad et al. 2020).

همانطور که در بالا اشاره شد، اصلی‌ترین مرحله جهت تهیه این نوع نوشیدنی، برشته کردن است. این فرآیند موجب ارتقاء عطر و طعم نوشیدنی، از بین رفتن آلاینده‌ها و میکروارگانیسم‌های نامطلوب و افزایش ماندگاری آن می‌شود. همچنین برشته کردن منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌هایی می‌شود که تسریع نابودی مواد مغذی را به دنبال دارند (Fikry Mohammad et al. 2019b). اگرچه تغییرات شیمیایی و فیزیکی رخ داده در حین برشته کردن هسته خرما به‌طور کامل توصیف نشده است، اما منطقی است که فرض کنیم برخی از این تغییرات ممکن است مشابه آنچه در برشته کردن قهوه اتفاق می‌افتد، باشد (Ghnimi et al. 2015). برشته کردن قهوه سبز معمولاً در محدوده دمایی ۱۸۰ الی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود که تغییرات قابل توجه در خصوصیات شیمیایی، فیزیکی و حسی دانه‌های قهوه را به دنبال خواهد داشت. در حین فرآیند برشته شدن، واکنش‌های موازی و متوالی شامل واکنش میلارد، تجزیه قند (کارامل‌سازی) و اکسیداسیون لیپیدها اتفاق می‌افتد. علاوه بر تقویت رنگ، عطر و طعم، که از ویژگی‌های معمول موثر بر مقبولیت قهوه هستند، ترکیبات نامطلوب نیز در نتیجه این واکنش‌ها ایجاد می‌شوند (Hamzalıoğlu and Gökmen 2020).

آکریل‌آمید یکی از این ترکیبات نامطلوب است که در نتیجه فرآیند برشته شدن قهوه شکل می‌گیرد و به‌عنوان یک ماده سرطان‌زا احتمالی شناخته می‌شود (WHO, 1994). آژانس بین‌المللی تحقیقات روی سرطان (IARC[1]) نیز آکریل‌آمید را در زمره ترکیبات سرطان‌زا و جهش‌زا بالقوه انسانی (گروه A۲) طبقه‌بندی کرده است (Badoud et al. 2020). آکریل‌آمید به‌لحاظ ساختاری یک جامد بلوری، بی‌بو، بی رنگ، با وزن مولکولی کم است که یک گروه وینیل آبدوست واکنش پذیر دارد. آکریل‌آمید در نتیجه واکنش میلارد و حین حرارت دادن محصولات غذایی ایجاد می‌شود و نتیجه واکنش میان آمینواسیدها و قندهای احیاکننده است. با توجه به مصرف بالای قهوه در جهان (حدودا ۱۶۶ میلیون بسته ۶۰ کیلوگرمی در سال ۲۰۲۱-۲۰۲۰) (ICO, 2021) ، سازمان ایمنی غذایی اروپا (EFSA)[2]، قهوه را یکی از منابع اصلی دریافت آکریل‌آمید در نظر گرفته است (Hamzalıoğlu and Gökmen, 2020). همان‌طور که در بالا نیز اشاره شد، امروزه مصرف قهوه هسته خرما به سرعت در کشورهای عربی و همچنین سایر کشورهای دنیا در حال رشد است. در نتیجه تعیین میزان آکریل‌آمید در این نوشیدنی نوظهور که به روشی مشابه قهوه، برشته و استخراج می شود، به لحاظ سلامتی مصرف‌کنندگان از اهمیت بالایی برخوردار است.

با توجه به خطر سرطان‌زایی آکریل‌آمید و اهمیت اندازه‌گیری آن در محصولات غذایی، تکنیک‌های کروماتوگرافی به‌عنوان اصلی‌ترین روش شناسایی و تعیین مقدار آن در نظر گرفته می‌شوند. ضرورت مشتق‌سازی در کروماتوگرافی گازی منجر به طولانی شدن فرآیند آنالیز می‌شود. همچنین درجه حرارت‌های بالای تزریق در این روش ممکن است منجر به تولید آکریل‌آمید و در نتیجه به‌دست آوردن نتایج نادرست شود (Wenzl et al. 2006). به لحاظ آشکارساز، در بیشتر مطالعات از آشکارساز طیف‌سنج جرمی همراه با کروماتوگرافی مایع یا گازی جهت تعیین مقدار آکریل‌آمید استفاده شده است که معمولا به ندرت در دسترس قرار دارد و علی‌رغم حساسیت بالا نیازمند ابزارهای گران‌قیمت و روش‌های آماده‌سازی پیچیده است. در این بین با توجه به در دسترس بودن آشکارساز مرئی- فرابنفش/آرایه دیود نوری (PDA[3]) در اکثر آزمایشگاه‌های آنالیز ترکیبات شیمیایی، امکان تشخیص آکریل‌آمید توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[4] به همراه این آشکارساز، یک مزیت محسوب می‌شود (Longhua et al. 2012, Samanipour et al. 2019). صرف نظر از روش بکارگیری، شناسایی و تعیین مقدار آکریل‌آمید در محصولات غذایی پیچیده مانند قهوه، نیازمند

1 International Agency for Research on Cancer (IARC)
2 European Food Safety Authority (EFSA)
3 UV-Vis/photodiode array detector (PDA)
4 High-performance liquid chromatography(HPLC)

آماده‌سازی‌های متعدد است (Cagliero et al. 2016). در سال‌های اخیر، روش‌های مدرن آماده‌سازی نمونه جهت به حداقل رساندن میزان مصرف حلال‌های آلی و نیز کاهش زمان استخراج، به شکل قابل توجهی توسعه یافته‌اند که در این بین روشی سریع و آسان جهت استخراج آکریل‌آمید از نمونه‌های پیچیده مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش موثر شامل دو مرحله است: استخراج آنالیت با حلال آلی از نمونه اصلی و سپس استفاده از فاز جامد پراکنده[1]، جهت تمیز کردن عصاره استخراجی (Surma et al. 2017). با توجه به فوائد هسته خرما و افزایش مصرف آن، بررسی ویژگی‌های آن از جهت مقدار آکریل‌آمید از نقطه نظر سلامتی از اهمیت بالایی برخوردار خواهد بود. لازم به ذکر است تاکنون هیچ داده‌ای مبنی بر محتوای آکریل‌آمید واریته‌های مختلف هسته خرما برشته شده و همچنین نوشیدنی حاصل از آن‌ها، در منابع منتشر نشده است. از این رو، هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی شناسایی و تعیین مقدار آکریل‌آمید پودر برشته هسته خرما و همچنین نوشیدنی موکا هسته خرما، به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از پنج گونه خرمای کبکاب، شاهانی، مضافتی، استعمران و زاهدی و همچنین قهوه عربیکا (*Coffea arabica*– با درجه برشتگی متوسط) استفاده شد که همگی از فروشگاه‌های معتبر خریداری شدند. استاندارد آکریل‌آمید با درصد خلوص ≥۹۹ درصد و جاذب‌های آمین‌های اول و دوم[2](PSA)، اکتادسیل‌سیلات[3] (C18) و تبادل‌گر یونی قوی[4] (SAX)، هر سه با درصد خلوص ۹۹/۹۹ درصد از شرکت سیگما و نمک‌های کلرید سدیم و سولفات منیزیم بدون آب به ترتیب با درصد خلوص ۹۹/۵ و ۹۹ درصد از شرکت CDH هند خریداری شد. استونیتریل و هگزان از شرکت مرک آلمان و متانول از شرکت فیشر انگلستان (هر سه با درجه کروماتوگرافی) تهیه شدند.

آماده‌سازی نمونه

هسته‌ها بعد از جداسازی از میوه خرما، شسته و در هوای آزاد خشک شده (شکل ۱) و سپس در برشته کن آزمایشگاهی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد برشته شدند. رطوبت هسته‌های خرمای برشته بعد از برشته شدن در محدوده‌ی ۰/۰۹– ۱/۹۰ درصد به‌دست آمد. لازم به ذکر است که به دلیل تفاوت در اندازه، شکل و ترکیبات شیمیایی واریته‌های هسته خرما، دما و زمان اعمال شده درجات مختلف برشتگی را در واریته‌های هسته خرما به دنبال داشت. هسته‌های خرمای برشته و دانه قهوه عربیکا جهت تهیه نوشیدنی توسط آسیاب، پودر و تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شدند (Juhaimi et al. 2012). جهت تهیه عصاره پودری، ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه با دمای ۳± ۶۰ درجه سانتی گراد به ۱ گرم پودر اضافه شده و بعد از ۵ دقیقه مخلوط شدن روی ورتکس، سانتریفوژ شده و فاز رویی جهت آنالیز جدا گردید. همچنین، به منظور تهیه نوشیدنی توسط موکا پات[5]، ۷/۵ گرم پودر انواع هسته خرما یا دانه قهوه عربیکا، داخل فیلتر فلزی مخصوص ریخته شد. کتری موکا با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه پر شد و تا جمع شدن تمام عصاره در ظرف رویی، روی حرارت قرار گرفت.

شکل ۱- آماده‌سازی هسته خرما استعمران

Fig. 1. Preparation of Estamaran variety date seed

استخراج آکریل‌آمید

استخراج آکریل‌آمید طبق روش Surma و همکاران (۲۰۱۷) با کمی تغییرات انجام گرفت (Surma et al. 2017). برای این منظور، ۵ میلی‌لیتر عصاره، به‌ترتیب با ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل و ۵ میلی‌لیتر هگزان مخلوط شد. ۴ گرم نمک سولفات منیزیم بدون آب و ۱ گرم نمک کلرید سدیم به نمونه اضافه شد و بعد از مخلوط شدن به مدت ۳ دقیقه روی ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، ۳ فاز در لوله آزمایش تشکیل شدند که

1 dispersive solid-phase extraction (d-SPE)
2 Primary and secondary amine (PSA)
3 C18–octadecylsilane
4 Strong ion exchange (SAX)
5 Moka pot

به ترتیب از پایین به بالا شامل آب به همراه نمک‌ها، استونیتریل و هگزان بودند. فاز وسط که حاوی استونیتریل بود، جدا شده و به‌منظور پاکسازی با سه جاذب PSA (۱۰۰ میلی‌گرم)، C18 (۵۰ میلی‌گرم) و SAX (۵۰ میلی‌گرم) و نمک سولفات منیزیم بدون آب (۳۰۰ گرم) ترکیب شد و بعد مخلوط شدن، مجددا به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی بعد از فیلتر شدن با فیلترهای سرسرنگی از نوع PVDF[1] (قطر ۲/۵ سانتی‌متر، حفرات ۰/۴۵ میکرومتر) به دستگاه تزریق شد (Surma et al. 2017).

شناسایی و تعیین مقدار آکریل‌آمید با کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

آنالیز کروماتوگرافی آکریل‌آمید با HPLC (KNAUER، آلمان)، به طریق فاز معکوس با کمک ستون Eurospher 100-5 C18 با طول ۲۵۰ و قطر ۴/۶ میلی‌متر انجام شد. روش کروماتوگرافی برای شناسایی آنالیت به لحاظ الف) نوع حلال، ب) نسبت حلال آلی به آب در فاز متحرک و ج) سرعت جریان فاز متحرک بهینه شد. جهت انتخاب فاز متحرک از دو ترکیب آب/ استونیتریل و آب/ متانول با نسبت‌های حجمی/ حجمی (۳:۹۷)، (۵:۹۵) و (۱۰:۹۰) استفاده شد. همچنین سه سرعت جریان ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه جهت بهینه‌سازی مقایسه شدند. ۲۰ میکرولیتر از نمونه (عصاره تمیز شده یا محلول‌های استاندارد) به ستون تزریق شدند و شناسایی آکریل‌آمید به‌وسیله آشکارساز PDA در طول موج ۲۰۲ نانومتر انجام گرفت. پردازش داده های کروماتوگرافی نیز با نرم افزار EZChrom Elite انجام شد. آنالیز کیفی با مقایسه زمان بازداری آنالیت و ترکیب استاندارد و همچنین مقایسه طیف دو نمونه انجام گرفت. جهت تعیین مقدار آنالیت در نمونه مجهول، محلول استاندارد آکریل‌آمید در محدوده غلظتی ۳۰۰۰ – ۵۰ میکروگرم بر لیتر در استونیتریل تهیه شده و به دستگاه تزریق شد. رسم منحنی کالیبراسیون با استفاده از سطح زیر پیک ترکیب استاندارد در مقابل غلظت جهت آنالیز کمی استفاده گردید.

اعتبار سنجی روش آنالیز کروماتوگرافی

این روش با در نظر گرفتن پارامترهای ضریب تعیین(R^2)، صحت (درصد بازیابی[2])، دقت (تکرار پذیری[3])، حداقل مقدار تشخیص[4](LOD) و حداقل مقدار اندازه‌گیری[5](LOQ) اعتبار سنجی شد.

- ضریب تعیین: ضریب تعیین با رسم منحنی کالیبراسیون و بررسی میزان خطی بودن تغییرات پاسخ دستگاه (سطح زیر نمودار) در مقابل غلظت‌های مختلف استاندارد محاسبه شد.
- دقت: جهت تعیین پارامتر دقت، محلول استاندارد آکریل‌آمید در سه سطح غلظتی ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر، طی سه روز متوالی، با چهار تکرار، به دستگاه تزریق شد و با مقایسه تفاوت سطح زیر پیک هر غلظت طی این سه روز، ضریب تغییرات (CV[6]) محاسبه شد.
- صحت: پارامتر صحت با افزودن غلظت مشخصی از استاندارد آکریل‌آمید به نمونه اصلی (spike) و تزریق آن به دستگاه، بدست آمد. به این منظور حجم برابری از محلول استاندارد آکریل‌آمید در سه سطح غلظتی کم، متوسط و زیاد (۵، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر لیتر) به نمونه اصلی اضافه شد. نمونه‌های غنی شده با آکریل‌آمید، تحت استخراج قرار گرفتند و بعد از تزریق عصاره‌های تمیز شده به دستگاه، با تقسیم جرم بدست آمده بر جرم مورد انتظار درصد بازیابی محاسبه شد.
- حداقل مقدار قابل تشخیص و اندازه‌گیری: جهت محاسبه مقادیر LOD و LOQ، از رابطه ۱ استفاده شد. در این فرمول S/N نسبت سیگنال به نویز (برای LOD ۳ و برای LOQ ۱۰)، c غلظت نمونه، N مقدار نویز زمان آنالیز نمونه شاهد و H مقدار سیگنال زمان آنالیز نمونه می‌باشد (Dias et al. 2010).

$$LOD, LOQ = c.S/N.N/H \quad (۱)$$

تعیین مقدار ملانوئیدین

ملانوئیدین‌ها درشت مولکول‌های قهوه‌ای رنگ محلول در آب و حاوی نیتروژن هستند که طی واکنش میلارد تولید می‌شوند و ممکن است تا ۲۵ درصد وزنی/ وزنی از ماده خشک قهوه را شامل شوند. لذا در این پژوهش، مقدار این ترکیبات نیز در هسته خرمای برشته و نوشیدنی حاصله، محاسبه گردید. ملانوئیدین هنگام حرارت دادن ایجاد می‌شود و ساختار و ترکیب آن بسته به در دسترس بودن پیش‌سازها متفاوت است (Bekedam et al. 2006). از آنجایی‌که ساختار مولکولی ملانوئیدین‌ها هنوز مشخص نشده است، محلول استانداردی هم برای آن وجود ندارد. لذا در منابع منتشر شده، برای رسم منحنی کالیبراسیون از عصاره قهوه به‌عنوان محلول استاندارد استفاده می‌شود. به این منظور، ابتدا جهت تهیه محلول مادر، عصاره آبی قهوه عربیکا به نسبت ۱ به ۲ رقیق شد و سپس محلول مادر ده بار رقیق شد. بعد از قرائت جذب هر

1 Polyvinylidene fluoride (PVDF)
2 Percentage of Recovery
3 Repeatability
4 Limit of detection(LOD)
5 Limit of quantification(LOQ)
6 Coefficient of Variation (CV)

رقت در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج فرابنفش-مرئی (Unico، آمریکا)، غلظت هر رقت با استفاده از فرمول اصلاح شده بیر-لامبرت (رابطه ۲) تعیین شد:

$$C=A/ba \quad (۲)$$

در این فرمول C غلظت ملانوئیدین، A جذب رقت، b طول سل طیف‌سنج (۱ سانتی‌متر) و a ضریب خاموشی ویژه[1](۱/۱۲۸۹ لیتر بر گرم سانتی‌متر) است. جهت تعیین مقدار ملانوئیدین نوشیدنی موکا نیز نمونه‌ها به نسبت ۱ در۱۰ رقیق شدند و جذب آن‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. نتایج بعد از اعمال ضریب رقت، به صورت گرم ملانوئیدین در ۱۰۰ گرم نمونه بیان شد (Pérez-Hernández et al. 2012). لازم به ذکر است تمام اجزا ملانوئیدین دارای شاخص قهوه‌ای شدن بالایی هستند. در نتیجه مهمترین شاخص حضور محصولات واکنش میلارد، جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر است که بیانگر شاخص قهوه‌ای شدن و تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای رنگ است (Madrau et al. 2010). لازم به ذکر است که در این طول موج تمامی ترکیبات قهوه‌ای رنگ دارای چگالی نوری خواهند بود برای همین از این طول موج در محاسبات مربوط به ملانوئیدین استفاده می‌شود (Hirano et al. 1996).

آزمون تعیین پارامترهای رنگی

جهت بررسی رنگ نمونه‌های پودری و نوشیدنی، تصویربرداری نمونه‌ها با استفاده از دوربین Canon-1000D انجام شد. به این منظور از ۱۱ لامپ ۱۰ واتی فلورسنت با زاویه ۴۵ درجه در کابین دوربین استفاده شد. تمامی نمونه‌ها با حجم و مقدار ثابت (نمونه پودری ۲۰ گرم و نمونه مایع ۱۰ میلی‌لیتر)، در فاصله۲۰ سانتی‌متری از لنز دوربین قرار گرفتند. بزرگنمایی لنز ۵۵ و سرعت شاتر روی $\frac{1}{5}$ تنظیم شد. عکس‌ها در فضای RGB[2] با استفاده نرم افزار EOS Utility به کامپیوتر منتقل شدند. پارامترهای رنگی درفضای L^*، a^* و b^* با استفاده از نرم‌افزار ImageJ به‌وسیله plugin با عنوان Convertor-Space-Color استخراج شد. L^* میزان روشنایی از صفر (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید) را مشخص می‌کند. همچنین پارامترهای a^* از ۱۰۰(قرمز) تا ۱۰۰- (سبز) و b^* از ۱۰۰(زرد) تا ۱۰۰- (آبی) اندازه‌گیری می‌شوند (Zheng et al. 2006).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، تمامی آزمون‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی، با سه تکرار انجام شد. نتایج به‌دست آمده به کمک روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p<۰/۰۵$) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

بهینه سازی شرایط آنالیز آکریل‌آمید با کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

شرایط بهینه شده نهایی دستگاه HPLC جهت شناسایی و تعیین مقدار آکریل‌آمید در جدول ۱ نشان داده شده است. شرایط بهینه امکان آنالیز آکریل‌آمید را در زمانی کمتر از پنج دقیقه فراهم کرد. آکریل‌آمید یک مولکول قطبی قوی با بازداری ضعیف است که معمولا آنالیز آن با ستون‌های غیرقطبی و یا قطبی ضعیف منجر به ظهور پیک با ظاهری نامناسب می‌شود (Zhang et al. 2007). با این حال، اکثر محققان به دلیل قطبیت بالای آکریل‌آمید، از کروماتوگرافی فاز معکوس استفاده کرده‌اند که به همین منظور در این پژوهش نیز از ستون غیرقطبی C18 استفاده شد.

باتوجه به اینکه استفاده از آب ۱۰۰ درصد حجمی، برای فاز متحرک منجر به پهن شدن بیش از حد پیک نمونه می‌شود (Wang et al. 2008) و از طرفی استفاده از آب بدون حضور حلال آلی کاهش طول عمر ستون کروماتوگرافی را در پی خواهد داشت، در پژوهش حاضر، بهینه سازی ترکیب فاز متحرک با استفاده از مخلوط آب/ متانول و آب/ استونیتریل با نسبت‌های حجمی/ حجمی (۳:۹۷)، (۵:۹۵) و (۱۰:۹۰) مورد آزمون قرار گرفت. کروماتوگرام‌های بدست آمده از آنالیز محلول استاندارد آکریل‌آمید با غلظت ۱ ppm با استفاده از فازهای متحرک متفاوت در شکل ۲ نشان داده شده است. تفاوت نسبت حلال‌های آلی مختلف، تاثیر مشابهی بر زمان بازداری داشت به طوری که در هر دو فاز متحرک با کاهش نسب حلال آلی از ۱۰ درصد حجمی به ۳ درصد حجمی، زمان بازداری افزایش یافت. طبق شکل ۲ (d,e,f)، حضور متانول در فاز متحرک، باعث عدم جداسازی مناسب پیک آکریل‌آمید و ناخالصی‌های موجود در نمونه هسته خرما و قهوه برشته شد که پهن شدن پیک استاندارد در هر سه سطح نسبتی آب/ متانول، این امر را تصدیق می‌کند، درحالی‌که ترکیب استونیتریل/ آب (شکل ۲- a,b,c)، توانایی مطلوبی در جداسازی پیک آکریل‌آمید و ناخالصی‌ها داشت و منجر به ظهور پیک‌هایی به مراتب بلندتر و باریک‌تر شد.

بررسی منابع نشان می‌دهد که اگر قدرت شست‌وشوی[3] حلال نمونه تزریق شده، بیشتر از حلال فاز متحرک باشد، می‌تواند در جذب سطحی نمونه در سر ستون اختلال ایجاد کند و معمولا پهن شدن پیک

[1] Specific extinction coefficient
[2] Red, Green and Blue(RGB)
3 Elution Strength

به این امر نسبت داده می‌شود (Keunchkarian et al. 2006). در نتیجه با توجه به اینکه حلال محلول استاندارد تزریق شده، استونیتریل بود و قدرت استونیتریل بیشتر از متانول است، این خاصیت خود باعث پهن شدن پیک نمونه به هنگام استفاده از مخلوط آب/ متانول به‌عنوان فاز متحرک خواهد شد. پهن شدن پیک فرآیندی نامطلوب در کروماتوگرافی است که موجب کاهش کارایی ستون کروماتوگرافی می‌شود. هدف اصلی در کروماتوگرافی، تلاش برای هرچه باریک‌تر کردن پیک و درنتیجه جداسازی کامل پیک نمونه و تداخل‌گرها و افزایش حساسیت آنالیز است. انتخاب حلال مناسب فاز متحرک، نقش مهمی در به دام انداختن آنالیت و به حداقل رساندن تداخل ماتریکس نمونه دارد (Keunchkarian et al. 2006). نتایج این پژوهش نشان داد حلال استونیتریل نسبت به متانول توانایی بهتری در جداسازی پیک نمونه و تداخل‌گرها دارد. همچنین لازم به ذکر است که فشار وارد بر ستون توسط حلال آب/ متانول بیشتر از حلال آب/ استونیتریل بود که این امر به بیشتر بودن چگالی متانول نسبت به استونیتریل مربوط می‌شود. در نتیجه با توجه به پهن شدن شدید پیک، جداسازی نامطلوب و کاهش محسوس سطح پیک نمونه و افزایش فشار ستون هنگام استفاده از ترکیب آب/ متانول به‌عنوان فاز متحرک، ترکیب آب/ استونیتریل جهت آنالیز آکریل‌آمید در انواع هسته خرمای برشته انتخاب شد.

جدول ۱- شرایط HPLC-PDA جهت آنالیز آکریل‌آمید در هسته خرما و قهوه برشته شده

Table 1- The HPLC-PDA conditions for analyzing acrylamide in roasted date seed and roasted coffee

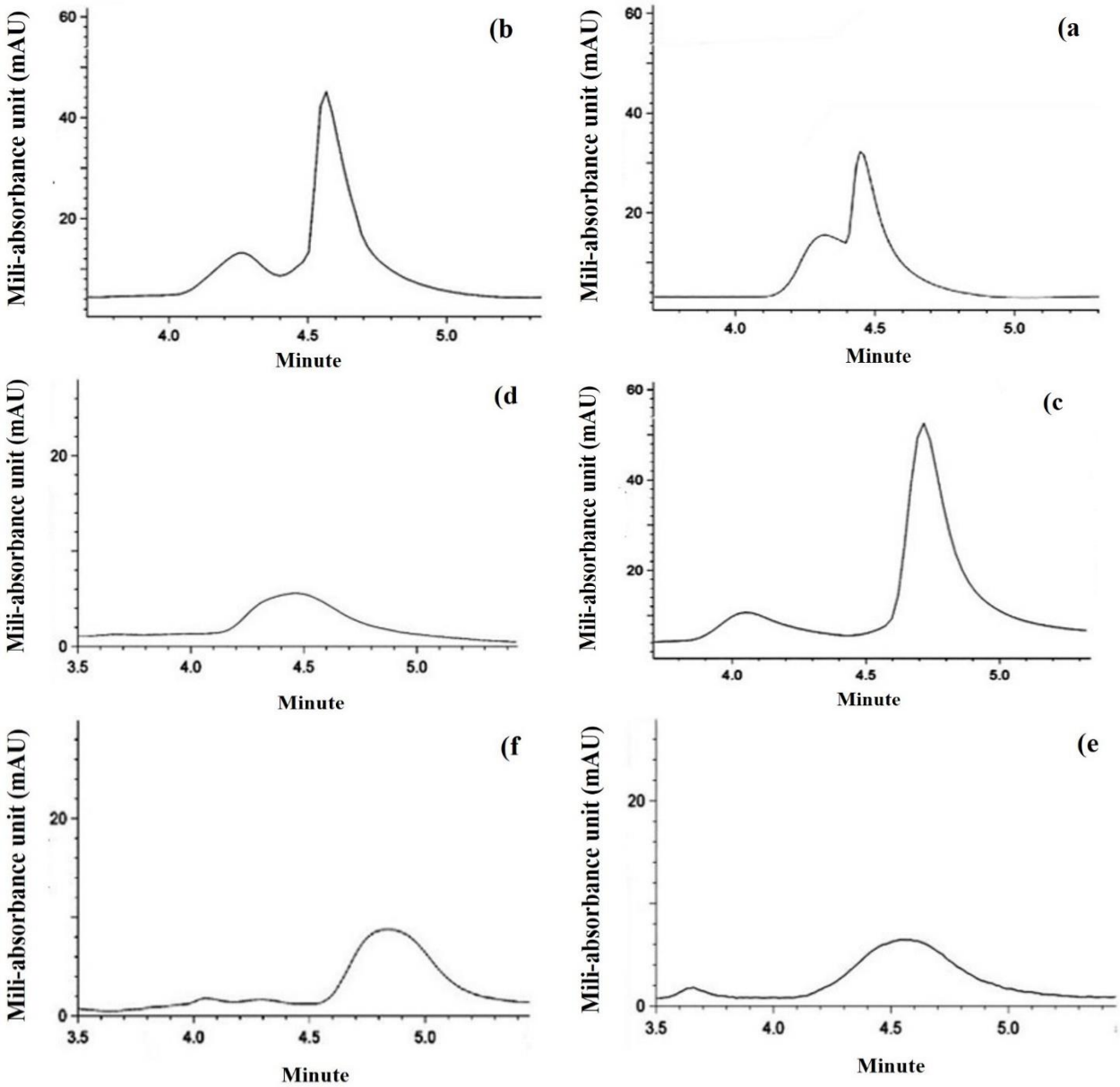
Mobile phase **فاز متحرک**	Water (97%) / Acetonitrile (3%)
Flow rate **سرعت جریان**	0.7 ml/min
Column temperature **دمای ستون**	25 °C
Injection volume **حجم تزریق**	20 µL
Wavelength **طول موج**	202 nm

نتایج مشابهی توسط Wang و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد. آن ها، جهت انتخاب فاز متحرک برای آنالیز آکریل‌آمید در انواع غذاهای سنتی چینی، مخلوط آب/ استونیتریل و آب/ متانول را مقایسه کردند. نتایج نشان داد جداسازی آکریل‌آمید و تداخل‌گرهای نمونه، به هنگام استفاده از متانول به عنوان فاز متحرک رضایت‌بخش نبود، درحالیکه استونیتریل توانایی مطلوبی در جداسازی پیک آکریل‌آمید و تداخل‌گرها داشت، به‌طوری‌که پیک آکریل‌آمید در حضور استونیتریل با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، بعد از ۷ دقیقه ظاهر شد (Wang et al. 2008). این پژوهشگران نیز به سه دلیل از مخلوط آب/ استونیتریل به عنوان فاز متحرک استفاده کردند: ۱- استونیتریل در تشخیص طول موج‌های کوتاه‌تر (۲۰۲ نانومتر) حداقل تعداد پیک‌های تداخل‌گر را ایجاد کرد، ۲- کاهش فشار ستون با تغییر فاز متحرک از آب/ متانول به آب/ استونیتریل و ۳- توانایی بالا استونیتریل در جداسازی تداخل‌گرها. به طور کلی، اگرچه استفاده از مخلوط آب/متانول نیز به‌عنوان فاز متحرک جهت آنالیز آکریل‌آمید قهوه برشته شده در برخی منابع گزارش شده است (Mastovska and Lehotay 2006, Rattanarat et al. 2021)، اما کاربرد آب/ استونیتریل به این منظور رایج‌تر بوده و بیشتر پیشنهاد می‌شود (Bagdonaite et al. 2008, Bertuzzi et al. 2020, Wang et al. 2008). با توجه به ترکیب شیمیایی هسته خرما، نتایج پژوهش حاضر نیز بیانگر مناسب بودن ترکیب آب/ استونیتریل برای آنالیز آکریل‌آمید در عصاره هسته خرمای برشته است که تا کنون در منابع دیگر به آن اشاره نشده بود.

با توجه به شکل ۲ افزایش نسبت آب در فاز متحرک، تاثیر مشهودی بر جداسازی آکریل‌آمید و ناخالصی‌ها داشت، به‌طوری‌که با کاهش نسبت آب از ۹۷ درصد حجمی به ۹۰ درصد حجمی، جداسازی نمونه و ناخالصی‌ها کم‌تر و در نتیجه پیک استاندارد پهن‌تر شد. با توجه به جداسازی مطلوب پیک نمونه و تداخل‌گرها و ظهور پیک بلندتر و باریکتر، به هنگام استفاده از مخلوط آب/ استونیتریل (۳:۹۷ حجمی/ حجمی)، این ترکیب به عنوان فاز متحرک بهینه انتخاب شد (شکل ۲-a).

شکل ۳ کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز آکریل‌آمید با سه سرعت جریان ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه را نشان می‌دهد. با استفاده از سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، جداسازی نمونه و تداخل‌گرها رضایت‌بخش نبود، به طوری که پیک نمونه پهن و زمان بازداری طولانی شد. افزایش سرعت جریان از ۰/۵ به ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه، علاوه بر کاهش زمان بازداری از ۵/۲ به ۴/۷ دقیقه، منجربه تفکیک

پذیری مطلوب آنالیت و تداخل‌گرها، ظهور پیک باریک و بلند و در نتیجه بهبود حساسیت روش شد. این درحالی است که افزایش سرعت جریان به ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، علی‌رغم کاهش اندک زمان بازداری، مانع از جداسازی مناسب پیک نمونه و تداخل‌گرها شد و حساسیت آنالیت به وضوح کاهش یافت. به این ترتیب سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان سرعت جریان بهینه انتخاب گردید.



شکل ۲- کروماتوگرام‌های حاصل از بهینه‌سازی ترکیب فاز متحرک: a) آب/استونیتریل (۱۰:۹۰)، b) آب/استونیتریل (۵:۹۵)، c) آب/استونیتریل (۳:۹۷)، d) آب/متانول (۱۰:۹۰)، e) آب/متانول (۵:۹۵) و f) آب/متانول (۳:۹۷). سرعت جریان: ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه

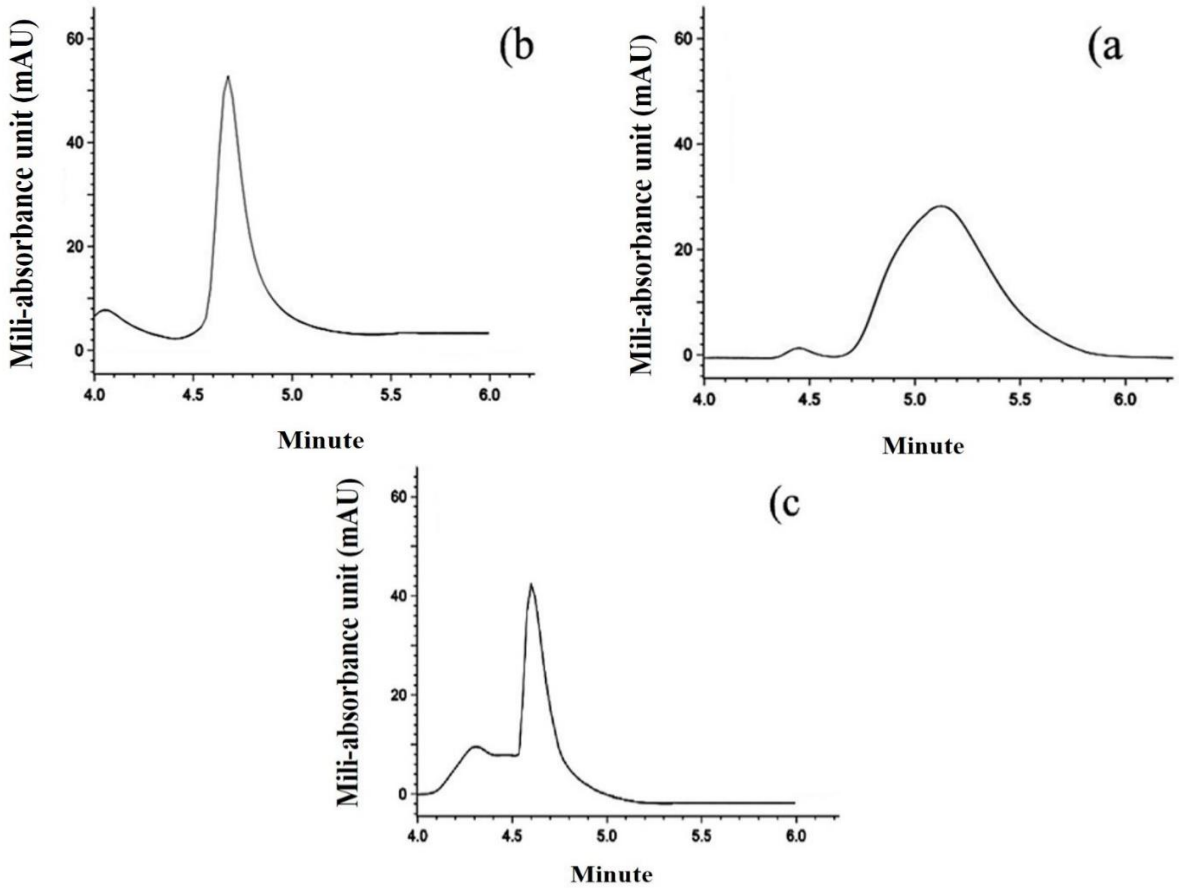
Fig. 2. Chromatograms obtained from various mobile phase composition icluding: a) water/acetonitrile (90:10, v/v), b) water/acetonitrile (95:5, v/v), c) water/acetonitrile (97:3, v/v), d) water/methanol (90:10, v/v), e) water/methanol (95:5, v/v) .and f) water/methanol (97:3, v/v). Flow rate: 0.70 mL/min

اعتبارسنجی روش آنالیز

اعتبارسنجی روش، فرآیندی است برای انجام ارزیابی‌های متعدد که به‌منظور تأیید مناسب بودن یک سیستم آنالیز و توانایی ارائه داده های تحلیلی سودمند و صحیح طراحی شده است. اعتبارسنجی روش‌های آنالیز دستگاهی، یک اصل جهت تعیین مقدار ترکیبات شیمیایی به حساب می‌آید. نتایج اعتبارسنجی روش مورد استفاده در

این پژوهش بیانگر کارایی قابل قبول آن در آنالیز آکریل‌آمید بود. در نتیجه در ادامه، پارامترهای اعتبارسنجی آنالیز آکریل‌آمید توسط HPLC-PDA با استفاده از روش بهینه شده در مرحله قبل، با تعیین پارامترهای دقت (تکرارپذیری)، صحت (درصد بازیابی)، ضریب تعیین (خطی بودن پاسخ در برابر غلظت) و حداقل مقدار قابل تشخیص (LOD) و اندازه‌گیری (LOQ) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ نشان داده شد.

نتایج بیان‌گر خطی بودن پاسخ دستگاه به آکریل‌آمید در محدوده غلظتی ۵۰ تا ۳۰۰۰ میکروگرم بر لیتر خطی بود به نحوی که ضریب تعیین ۰/۹۹۹۹ به‌دست آمد. نتایج ارزیابی دقت روش که با ضریب تغییرات (CV) بیان گردید نشان داد که تکرار پذیری این داده‌ها قابل قبول بود به طوری که ضریب تغییرات هر سه غلظت، کمتر از ۲ درصد گزارش شد. مقادیر LOD و LOQ با استفاده از سیگنال به نویز ۳ و ۱۰ به‌ترتیب ۹/۱ و ۳۰/۶۲ میکروگرم بر کیلوگرم محاسبه شد که در محدوده منحنی کالیبراسیون قرار داشته و با در نظر گرفتن مقدار آکریل آمید موجود در نمونه مجهول، قابل قبول گزارش شدند. روش استخراج بکار گرفته شده منجر به درصد بازیابی ۱۰۳ درصد شد که بیانگر کارایی روش بکار گرفته شده جهت استخراج و آنالیز آکریل‌آمید می‌باشد.



شکل ۳- کروماتوگرام‌های حاصل از بهینه‌سازی سرعت جریان فاز متحرک: a) سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، b) سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه و c) سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه. ترکیب فاز متحرک: آب/استونیتریل (۳:۹۷).

Fig. 3. Chromatograms obtained from the optimization of the flow rate: a) 0.50 mL/min, b) 0.70 mL/min, c) 1.00 mL/min. Mobile phase composition: water/acetonitrile (97:3, v/v).

Endeshaw و همکاران (۲۰۲۰)، مقادیر LOD و LOQ آنالیز آکریل‌آمید قهوه عربیکا توسط HPLC-DAD[1] را به‌ترتیب ۵ و ۲۰/۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش کردند که بیانگر حساسیت روش مورد استفاده است (Endeshaw and Belay 2020). همچنین، Samanipour و همکاران (۲۰۱۸)، مقادیر LOD و LOQ جهت آنالیز آکریل‌آمید چیپس سیب‌زمینی با HPLC-PDA را به ترتیب ۹ و ۲۷ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش کردند که با داده‌های حاصل از این پژوهش همخوانی دارد (Samanipour et al. 2019). Surma و

1 Diode-Array Detector (DAD)

همکاران (۲۰۱۷)، مقدار درصد بازیابی آکریل‌آمید نمونه‌های قهوه فوری را ۹۵ درصد گزارش کردند که با توجه به یکسان بودن روش استخراج، نتایج این پژوهش را تائید می‌کند (Surma et al. 2017). به‌طورکلی، نتایج حاصل از این پژوهش، از نظر حداقل مقدار قابل تشخیص یا اندازه‌گیری و درصد بازیابی، با نتایج سایر محققان مطابقت دارد و مقادیر بدست آمده در محدوده قابل قبول قرار دارند، بنابراین روش استخراج و آنالیز مورد استفاده در پژوهش حاضر، توانایی لازم جهت قضاوت درمورد نتایج به‌دست آمده را دارند.

تعیین مقدار آکریل‌آمید انواع نمونه

آکریل‌آمید در هسته خرما برشته شده با کمک تطابق زمان بازداری و طیف حاصل از آنالیز نمونه واقعی با محلول استاندارد آکریل‌آمید، شناسایی شد (شکل ۴). نتایج بررسی میزان آکریل‌امید در دانه قهوه عربیکا و انواع گونه هسته خرمای برشته شده در جدول ۳ نشان داده شده است.

نمونه‌ها از نظر محتوی آکریل‌آمید تفاوت معناداری با هم داشتند ($p<۰/۰۵$). نتایج بیانگر وجود مقادیر کمتر آکریل‌آمید در انواع هسته خرما نسبت به قهوه عربیکا بود (جدول ۳)، به‌طوری‌که میزان آکریل‌آمید پودر و نوشیدنی موکا قهوه عربیکا به ترتیب ۱۷/۴۴ ±۱۸۲۵/۲۳ میکروگرم بر کیلوگرم و ۴/۰۸ ±۳۴۵/۸۹ میکروگرم بر لیتر بدست آمد. مقدار آکریل‌آمید در انواع پودر هسته خرمای برشته نیز در محدوده ۳۶۰- ۱۲۹ میکروگرم بر کیلوگرم قرار داشت. همچنین نوشیدنی موکای حاصل از هسته خرما حاوی ۶۸- ۲۵ میکروگرم بر لیتر آکریل آمید بود.

جدول ۲- پارامترهای اعتبارسنجی آنالیز آکریل‌آمید در هسته خرما توسط HPLC-PDA

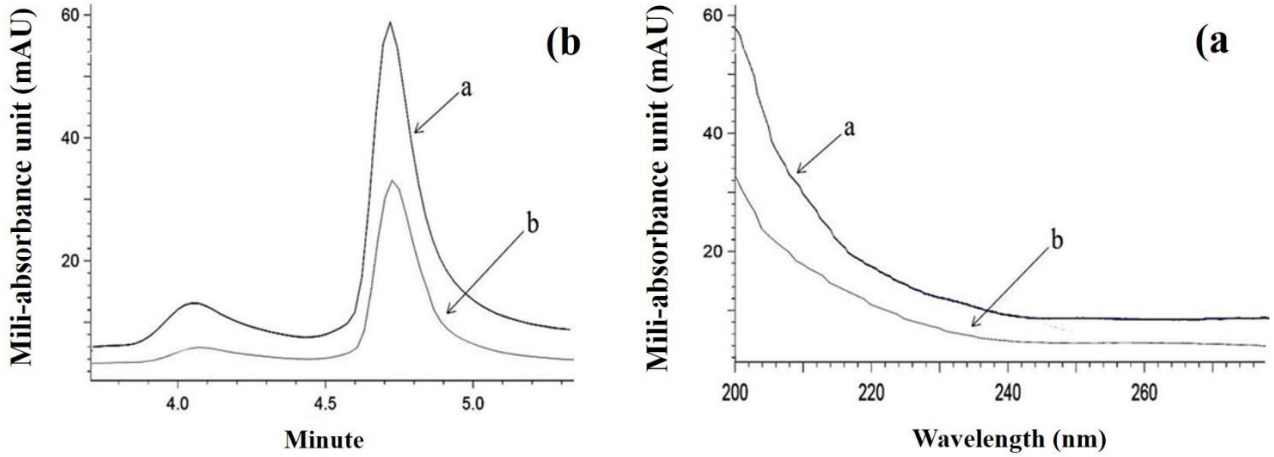
Table 2- Validation parameters for acrylamide analyzed by HPLC–PDA

Linearity range (µg/L) **محدوده خطی منحنی کالیبراسیون**		50-3000		
coefficient of determination (R^2) **ضریب تعیین**		0.9999		
LOD (µg/L) **حداقل مقدار قابل تشخیص**		9.1		
LOQ (µg/L) **حداقل مقدار قابل اندازه گیری**		30.62		
Accuracy (Recovery) **صحت (درصد بازیابی)**		103%		
	Standards (mg/L) **استانداردها (mg/L)**	**75**	**100**	**200**
Precision **دقت**	**Intra-day (%CV)** **در یک روز**	6.03	2.11	2.00
	Inter-day (%CV) **طی سه روز متوالی**	2.69	2.92	1.51

تاکنون هیچ داده‌ای مبنی بر تعیین محتوی آکریل‌آمید در هسته خرمای برشته شده گزارش نشده است اما باتوجه به اینکه هسته خرما حاوی پروتئین و قندهای احیاکننده است، تشکیل آکریل‌آمید در اثر برشته شدن آن، دور از انتظار نیست (Juhaimi et al. 2012). آکریل‌آمید از محصولات اصلی واکنش میلارد است که طی حرارت دادن مواد غذایی حاوی قندهای احیاکننده و آمینواسید آسپارژین، تشکیل می‌شود (Alves et al. 2010). کمتر بودن میزان آکریل‌آمید در هسته خرما نسبت به قهوه عربیکا را می‌توان به کمتر بودن پیش سازهای آن در هسته خرما (خصوصا به لحاظ میزان آمینو اسیدها) نسبت داد (Juhaimi et al. 2012). ویژگی‌های هسته گونه‌های مختلف خرما با توجه به تنوع و شرایط محیطی متفاوت است. کوددهی خاک، آبیاری، دمای روزانه، مدت زمان رشد و سایر تیمارهای پس از برداشت (خشک شدن یا مرطوب شدن بیشتر میوه) عواملی هستند که می‌توانند بر خواص فیزیکی میوه‌های خرما تأثیر بگذارند. می‌توان تصور کرد که این عوامل به احتمال زیاد بر هسته‌های خرما نیز تأثیر می‌گذارد. بنابراین با توجه به تفاوت ترکیبات شیمیایی انواع مختلف هسته خرما، اختلاف میزان آکریل‌آمید در واریته‌های مختلف قابل توجیه است (Golshan Tafti et al. 2017). در پژوهش Alves و همکاران (۲۰۱۰)، میزان آکریل‌آمید انواع پودر قهوه ۵/۷۵ ±۱۳۱/۷۹ تا ۲۰/۳۷ ±۲۱۹۱/۱۸ میکروگرم بر کیلوگرم و اسپرسو قهوه ۱/۳ ±۲۲/۸ تا ۱۶/۶ ±۳۹۰/۰

میکروگرم بر لیتر گزارش شد که در محدوده نتایج حاصل از پژوهش حاضر قرار داشت (Alves et al. 2010). Basaran و همکاران (۲۰۲۰)، میزان آکریل‌آمید نوشیدنی فیلتر، اسپرسو، لاته و موکا حاصل از قهوه را به‌ترتیب ۱۶/۸، ۲۵/۵، ۳۴/۱ و ۷۲/۸ میکروگرم بر لیتر گزارش کردند (Başaran et al. 2020).

تشکیل آکریل‌آمید در قهوه به شدت تحت تاثیر شرایط برشته کردن است. در شروع حرارت‌دهی، مقدار آکریل‌آمید به سرعت افزایش می‌یابد و می‌تواند به ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم برسد اما در ادامه خیلی زود کاهش می‌یابد، به همین دلیل با افزایش درجه برشتگی میزان آکریل‌آمید کاهش می‌یابد. بنابراین احتمال می‌رود که دانه‌هایی با برشتگی کمتر در مقایسه با انواع با برشتگی بالا، از محتوای آکریل‌آمید بالاتری برخوردار باشند. مطالعات نشان می‌دهد عوامل مختلفی همچون گونه قهوه، شرایط نگهداری، تخمیر و روش دم‌آوری می‌تواند بر شکل‌گیری آکریل‌آمید و میزان آن در نوشیدنی نهایی موثر باشند (Başaran et al. 2020).



شکل ٤- مطابقت زمان بازداری و طیف (طول موج ۲۰۲ نانومتر) محلول استاندارد ppm ۱ آکریل‌آمید و پودر هسته خرما کبکاب: Aa) طیف حاصل از محلول استاندارد، Ab) طیف حاصل از هسته خرما کبکاب، Ba) پیک محلول استاندارد، Bb) طیف حاصل از آنالیز پودر هسته خرما

Fig. 4. Comparing the retention time and spectrum (wavelength 202 nm) of acrylamide standard solution and roasted date seed (variety of Kabkab): aa) spectrum obtained from standard solution, ab) spectrum obtained from roasted date seed, ba) peak of acrylamide standard solution, Bb) peak of acrylamide in roasted date seed.

جدول ۳- میزان آکریل‌آمید در نمونه آسیاب شده و نوشیدنی موکای حاصله

Table 3- Acrylamide content in ground samples and their Moka brew

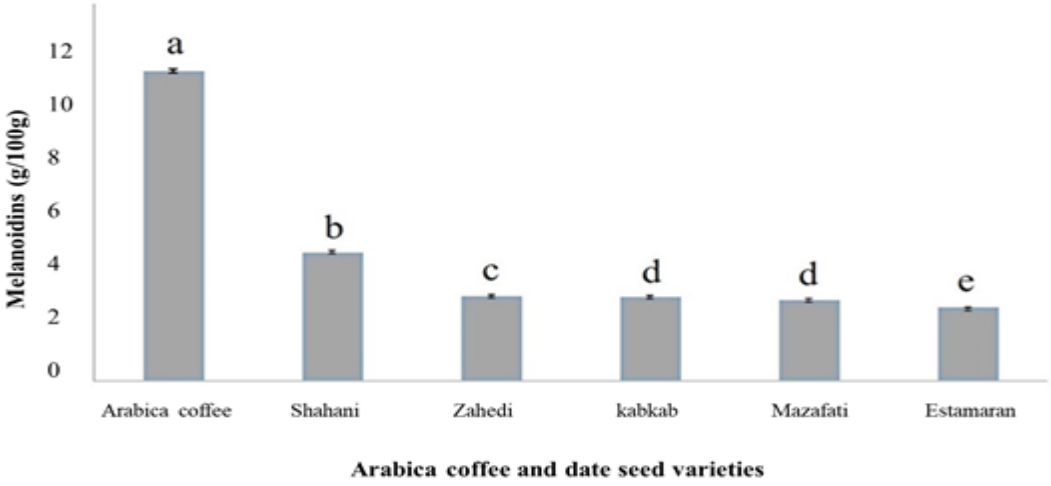
Samples نمونه	Ground samples (µg/kg) نمونه آسیاب شده	Moka (µg/L) موکا
Arabica coffee قهوه عربیکا	1825.23 ±17.44[a]	345.89±4.08[a]
Kabkab کبکاب	360.99 ±4.15[b]	68.06± 0.51[b]
Estamaran استعمران	301.07 ±5.98[c]	59.42 ±0.53[c]
Zahedi زاهدی	292.97± 4.71[c]	58.40± 0.68[c]
Shahani شاهانی	167.55± 3.25[d]	33.87± 0.20[d]
Mazafati مضافتی	129.43 ±2.37[e]	25.70 ±0.30[e]

*حروف(a,b,..) در هر ستون، بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

Different letters in a column denote significant differences ($p<0.05$)*

تعیین مقدار ملانوئیدین نوشیدنی موکا

ملانوئیدین‌ها ترکیبات پلیمری نیتروژن‌دار، آنیونی، ناهمگون و قهوه‌ای رنگ هستند که در مراحل پایانی واکنش میلارد تشکیل می شوند و در رنگ، طعم و بافت محصول نهایی دخیل هستند (Keunchkarian et al. 2006, Pastoriza et al. 2012). نتایج آنالیز آماری نشان داد، اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$)، میان مقادیر ملانوئیدین نوشیدنی‌های موکا هسته خرما و قهوه عربیکا وجود دارد (شکل ۵). طبق نتایج به‌دست آمده بیشترین میزان ملانوئیدین به‌ترتیب مربوط به قهوه عربیکا، هسته خرما شاهانی، زاهدی، کبکاب، مضافتی و استعمران بود. Fikry و همکاران (۲۰۱۹) نیز حضور ملانوئیدین در قهوه هسته خرما را با تعیین شاخص قهوه‌ای شدن[1] و اندازه‌گیری جذب نوشیدنی رقیق شده (۵۰ میکرولیتر نوشیدنی در ۲ میلی‌لیترآب) در ۴۲۰ نانومتر نشان دادند. طبق نتایج این گروه از محققین، افزایش شدت برشته کردن، افزایش شاخص قهوه‌ای شدن را به دنبال داشت (Fikry et al. 2019a).



شکل ۵- مقادیر ملانوئیدین نوشیدنی موکا تهیه شده از قهوه عربیکا و واریته‌های مختلف هسته خرما.

حروف (a,b,..) در هر ستون، بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

Fig. 5. Melanoidin content of Moka drinks prepared from arabica coffee and different varieties of date seed. Letters (a,b,..) in each column indicate a significant difference at the level of 0.05.

به لحاظ میزان ملانوئیدین در قهوه، نتایج ما با یافته‌های Vignoli و همکاران (۲۰۱۱) اندکی تفاوت داشت. آن‌ها میزان ملانوئیدین قهوه عربیکا را در درجات برشتگی متفاوت بین ۱۹ الی ۲۹ گرم بر ۱۰۰ گرم قهوه گزارش کردند. این تفاوت در نتایج می‌تواند به روش متفاوت اندازه گیری ملانوئیدین در پژوهش آن‌ها مربوط باشد. همچنین این محققین از دما و فشار بالایی برای استخراج عصاره استفاده کرند که می‌تواند به استخراج بیشتر ملانوئیدین از نمونه نیز منجر شود (Vignoli et al. 2011). Pérez-Hernández و همکاران (۲۰۱۲) نیز مقدار ملانوئیدین قهوه فرانسه، ایتالیایی و فوری را به‌ترتیب ۱/۷۰ ±۲۴/۷۴، ۱/۸۰ ±۲۴/۷۹ و ۰/۲۱ ±۶۷/۶۱ گرم در ۱۰۰ گرم نمونه گزارش کردند. Lopes و همکاران (۲۰۱۶) میزان ملانوئیدین در انواع قهوه اسپرسو (از نوع کپسول) را ۱۴۵- ۶۹ میلی‌گرم در فنجان (به‌طور متوسط ۴۰ میلی لیتر) گزارش کردند (Lopes et al. 2016) که با در نظر گرفتن وزن متوسط پودر قهوه در هر کپسول (۷-۵گرم)، به طور تقریبی معادل ۳- ۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم قهوه خواهد بود.

Baum و همکاران (۲۰۰۸)، نشان دادند که تقریبا ۹۰ درصد آکریل آمید موجود در قهوه به ترکیبات ماتریس قهوه متصل است و اغلب در اتصال با ترکیبات رنگ‌دار موجود در دانه قهوه استخراج می‌شود (Baum et al. 2008). در ادامه، Pastoriza و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی واکنش میان آکریل‌آمید و ملانوئیدین را در یک سیستم مدل مورد بررسی قرار دادند. یافته‌های آن‌ها بیانگر کاهش آکریل‌آمید در حضور مقادیر بالای ملانوئیدین بود. آن‌ها گروه‌های آمینه هسته دوست ناشی از باقیمانده پروتئینی اسکلت ملانوئیدین را عامل این کاهش در میزان آکریل‌آمید در حین برشته کردن قهوه معرفی کردند. افزودن

1 Browning Index

اسیدهای آمینه آزاد (به غیر از آسپارژین به‌عنوان پیش‌سازهای آکریل آمید) مانند گلیسین، لیزین و سیستئین، می‌تواند غلظت آکریل‌آمید را در محصولات تحت تیمار حرارتی، کاهش دهد (Pastoriza et al. 2012). در پژوهش حاضر نیز در اغلب موارد، رابطه عکسی بین محتوای آکریل‌آمید و ملانوئیدین در هسته خرمای برشته شده مشاهده شد. به عنوان مثال هسته خرمای شاهانی آکریل‌آمید کم و ملانوئیدین بالایی داشت. به‌طور مشابه، مقادیر بالای آکریل‌آمید و کمتر ملانوئیدین در هسته خرمای کبکاب مشاهده شد. در نتیجه نتایج حاصل از محتوای ملانوئیدین تا حد زیادی تاییدکننده روند میزان آکریل‌آمید در انواع هسته خرما است.

تعیین پارامترهای رنگی

داده‌های مربوط به رنگ پودرها و نوشیدنی موکا تهیه شده از قهوه عربیکا و انواع واریته هسته خرما در جدول ۴ آمده است. نتایج نشان داد مقدار L^* در قهوه عربیکا به‌طور قابل توجهی کمتر از انواع مختلف هسته خرما است که بیانگر بیشتر بودن درجه برشتگی قهوه نسبت به هسته خرما می‌باشد. همچنین بین نمونه‌های پودر هسته خرمای برشته، بیشترین مقدار L^* مربوط به هسته خرما شاهانی و کمترین مربوط به هسته خرمای استعمران و مضافتی بود.

جدول ٤- پارامترهای رنگ نمونه‌های آسیاب شده و نوشیدنی موکا تهیه شده از قهوه عربیکا و انواع هسته خرمای برشته

Table 4- Color parameters of ground samples and Moka brew prepared from Arabica coffee and roasted date seeds

	Samples نمونه‌ها	L^*	a^*	b^*
Ground sample نمونه آسیاب شده	Arabica coffee قهوه عربیکا	19.97± 0.23^{a}	7.43± 0.06^{a}	9.73± 0.08^{a}
	Kabkab کبکاب	31.14 ±0.09^{e}	13.31± 0.16^{d}	19.61 ±0.15^{d}
	Estamaran استعمران	26.34 ±0.14^{b}	9.79± 0.07^{b}	15.00 ±0.01^{b}
	Zahedi زاهدی	29.39± 0.23^{d}	11.24± 0.11^{c}	17.71± 0.10^{c}
	Shahani شاهانی	34.15 ±0.18^{f}	15.74 ±0.12^{e}	22.48 ±0.33^{e}
	Mazafati مضافتی	26.97 ±0.26^{c}	9.63 ±0.16^{b}	15.43 ±0.20^{b}
Moka brew نوشیدنی موکا	Arabica coffee قهوه عربیکا	29.61 ±0.39^{a}	29.97± 0.15^{e}	20.66± 0.23^{a}
	Kabkab کبکاب	73.75± 0.49^{c}	3.72 ±0.06^{a}	30.32± 0.14^{e}
	Estamaran استعمران	72.02± 1.05^{b}	4.09 ±0.07^{b}	27.38± 0.17^{b}
	Zahedi زاهدی	73.50 ±0.02^{c}	4.79± 0.06^{c}	29.49± 0.25^{d}
	Shahani شاهانی	74.54± 0.21^{d}	6.45 ±0.12^{d}	32.30 ±0.17^{f}
	Mazafati مضافتی	72.54± 0.21^{c}	4.51± 0.11^{c}	28.61 ±0.02^{c}

*حروف(a,b,..) در هر ستون، بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

* Different letters in a column denote significant differences ($p<0.05$)

بررسی داده‌ها نشان داد که پارامترهای a^* و b^* تا حد زیادی از الگوی ملانوئیدین پیروی می‌کنند. به نحوی که با افزایش میزان a^* و b^* و افزایش شدت رنگ قهوه‌ای، میزان ملانوئیدین هم در نمونه‌ها افزایش یافته است. هسته خرمای شاهانی با بالاترین محتوای ملانوئیدین، بالاترین میزان a^* و b^* را نیز به خود اختصاص داد. به شکل مشابه، هسته خرمای استعمران، از کمترین میزان a^* و b^* و

ملانوئیدین برخوردار بود. Şenyuva و همکاران (۲۰۰۵) رابطه مستقیمی بین a^* و آکریل‌آمید پیدا کردند که با نتایج ما در تضاد بود (Şenyuva and Gökmen 2005). بعد از تهیه نوشیدنی، پارامترهای رنگی به شدت تحت تاثیر قرار گرفتند، خصوصا پارامتر L^* با افزایش قابل توجهی همراه بود که بیانگر روشن‌تر بودن قهوه موکای تهیه شده از هسته خرما در مقایسه با دانه عربیکا بود. این نتایج می‌تواند با کمتر بودن نرخ استخراج ترکیبات از جمله ترکیبات رنگی از هسته خرما در مقایسه با قهوه عربیکا توجیه شوند. همچنین رنگ نوشیدنی به‌طور محسوسی زردتر شد که با کاهش a^* و افزایش b^* همراه بود.

Ghnimi و همکاران (۲۰۱۵)، تغییرات پارامترهای رنگی سه گونه هسته خرما را طی برشته شدن به مدت شش ساعت و نیم، بررسی کردند (Ghnimi et al. 2015). طبق نتایج این پژوهشگران طی فرآیند برشته کردن مقدار L^* از ۴۷ به ۱۵، a^* از ۱۶ به حدود ۱ و b^* از ۲۴ به نزدیک صفر کاهش یافت که این مقادیر در محدوده نتایج پژوهش حاضر قرار داشت. همچنین در مقالات مقدار L^* قهوه با درجه برشتگی متوسط ۱۸ تا ۱۹ گزارش شده که با نتایج ما همخوانی دارد (Herawati et al. 2019). در پژوهش Fikry و همکاران (۲۰۱۹)، مقادیر پارامترهای L^*، a^* و b^* پودر هسته خرما با درجه برشتگی متوسط تیره[1] به‌ترتیب ۴۱- ۳۷، ۱۵ -۱۴ و ۲۰ -۱۹ گزارش شد که تقریبا با مقادیر به‌دست آمده از هسته خرما شاهانی و کبکاب همخوانی دارد (Fikry et al. 2019a).مقادیر به‌دست آمده از سایر گونه‌های هسته خرما کمتر از مقادیر گزارش شده توسط این پژوهشگران بود. Babiker و همکاران (۲۰۲۰) نیز تاثیر شدت فرایند برشته کردن را بر پارامترهای رنگ هسته خرما بررسی کرده و نشان دادند که با افزایش شدت تیمار حرارتی، کلیه پارامترهای رنگی به‌طور محسوسی کاهش پیدا می‌کنند (Babiker et al. 2020). آنها، میزان پارامترهای L^*، a^* و b^* را به ترتیب ۳۷- ۲۷، ۸- ۰/۷۶- و ۱۲- ۵ گزارش کردند. نتایج L^* آن‌ها با نتایج ما همخوانی داشت. این تفاوت بین نتایج پژوهش حاضر و یافته های سایر محققین، با توجه به استفاده از گونه‌های هسته خرما با ترکیبات شیمیایی متفاوت و نیز تفاوت شرایط برشته شدن قابل توجیه است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش بهینه سازی شرایط دستگاه HPLC-PDA جهت آنالیز آکریل‌آمید در ۵ واریته هسته خرمای برشته شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد استفاده از فاز متحرک آب/ استونیتریل (نسبت حجمی/ حجمی ۳:۹۷) با سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه، منجر به جداسازی مطلوب پیک نمونه و تداخل‌گرها و ظهور پیک بلند، باریک و تمیز می‌شود. این روش بهینه، جهت آنالیز آکریل‌آمید نمونه‌های پودری و نوشیدنی موکا قهوه عربیکا و انواع هسته خرمای برشته شده مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاکی از حضور مقدار قابل توجه آکریل‌آمید در هسته خرما برشته شده بود به طوری که مقدار آن از ۲/۳۷ ±۱۲۹/۴۳ تا ۴/۱۵ ±۳۶۰/۹۹ میکروگرم بر کیلوگرم در گونه‌های مختلف متغیر بود. همچنین، محتوی آکریل‌آمید قهوه عربیکا به‌طور معنی‌داری بیشتر از انواع هسته خرما (۱۷/۴۴ ±۱۸۲۵/۲۳) به‌دست آمد. بیشترین میزان ملانوئیدین به‌ترتیب مربوط به قهوه عربیکا، هسته خرما شاهانی، زاهدی، کبکاب، مضافتی و استعمران بود. بررسی نتایج ملانوئیدین نشان داد در برخی گونه‌های هسته خرما (مانند شاهانی و کبکاب) بین میزان آکریل‌آمید و ملانوئیدین رابطه عکس وجود دارد. طبق ارزیابی نتایج پارامترهای رنگی، پارامترهای a^* و b^* تا حد زیادی از الگوی ملانوئیدین پیروی می‌کنند، به نحوی که با افزایش میزان a^* و b^* و افزایش شدت رنگ قهوه‌ای، میزان ملانوئیدین هم در نمونه‌ها افزایش یافت. همچنین بعد از تهیه نوشیدنی موکا شاهد افزایش معنی‌دار تمامی پارامترهای رنگی، به‌خصوص پارامتر L^* نسبت به پودر نمونه‌ها بودیم.

تشکر و قدردانی

تحقیق نویسنده مسئول از حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد (۳/۵۱۶۹۴) برخوردار بوده است.

منابع

1. Al-Farsi M, Alasalvar C, Al-Abid M, Al-Shoaily K, Al-Amry M, Al-Rawahy F. 2007. Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. Food chemistry 104:943-947. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.051
2. Al-Farsi MA, Lee CY. 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. Food chemistry 108:977-985. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.009
3. Alves RC, Soares C, Casal S, Fernandes J, Oliveira MBP. 2010. Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. Food chemistry 119:929-934. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.051

1 Medium dark

4. Babiker EE, Atasoy G, Özcan MM, Juhaimi FA, Ghafoor K, Ahmed IAM, Almusallam IA. 2020. Bioactive compounds, minerals, fatty acids, color, and sensory profile of roasted date (Phoenix dactylifera L.) seed. Journal of Food Processing and Preservation 44:e14495. https://doi.org/10.1111/jfpp.14495
5. Badoud F, Goeckener B, Severin K, Ernest M, Romero R, Alzieu T, Glabasnia A, Hamel J, Buecking M, Delatour T. 2020. Fate of acrylamide during coffee roasting and in vitro digestion assessed with carbon 14- and carbon 13-labeled materials. Food Chemistry 320:126601. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126601
6. Bagdonaite K, Derler K, Murkovic M. 2008. Determination of Acrylamide during Roasting of Coffee. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:6081-6086.
7. Başaran B, Aydın F, Kaban G. 2020. The determination of acrylamide content in brewed coffee samples marketed in Turkey. Food Additives & Contaminants: Part A 37:280-287. https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1685133
8. Baum M, Böhm N, Görlitz J, Lantz I, Merz KH, Ternité R, Eisenbrand G. 2008. Fate of 14C-acrylamide in roasted and ground coffee during storage. Mol Nutr Food Res 52:600-608. https://doi.org/10.1002/mnfr.200700413
9. Bekedam EK ,Schols HA, van Boekel MAJS, Smit G. 2006. High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. Journal of agricultural and food chemistry 54:7658-7666. https://doi.org/10.1021/jf0615449
10. Bertuzzi T, Martinelli E, Mulazzi A, Rastelli S. 2020. Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars. Food Chemistry 303:125372. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125372
11. Bijami A, Rezanejad F, Oloumi H, Mozafari H. 2020. Minerals, antioxidant compounds and phenolic profile regarding date palm (Phoenix dactylifera L.) seed development. Scientia Horticulturae 262:109017. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109017
12. Bouhlali EdT, Hmidani A, Bourkhis B, Khouya T, Ramchoun M, Filali-Zegzouti Y, Alem C. 2020. Phenolic profile and anti-inflammatory activity of four Moroccan date (Phoenix dactylifera L.) seed varieties. Heliyon 6:e03436. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03436
13. Cagliero C, Ho TD, Zhang C, Bicchi C, Anderson JL. 2016. Determination of acrylamide in brewed coffee and coffee powder using polymeric ionic liquid-based sorbent coatings in solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1449:2-7. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.034
14. Dias RCE, Campanha FG, Vieira LGE, Ferreira LP, Pot D, Marraccini P, Benassi MDT. 2010. Evaluation of Kahweol and Cafestol in Coffee Tissues and Roasted Coffee by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology. Journal of agricultural and food chemistry 58:88-93.
15. Endeshaw H, Belay A. 2020. Optimization of the roasting conditions to lower acrylamide content and improve the nutrient composition and antioxidant properties of Coffea arabica. Plos one 15:e0237265.
16. FAO. 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations-Statistic Division https://www. fao. org/faost at/en/# data: QC.
17. Fikry M, Yusof YA, Al-Awaadh AM, Abdul Rahman R, Chin NL, Mousa E, Chang LS. 2019a. Effect of the Roasting Conditions on the Physicochemical, Quality and Sensory Attributes of Coffee-Like Powder and Brew from Defatted Palm Date Seeds. Foods 8.
18. Fikry M, Yusof YA, Al-Awaadh AM, Rahman RA, Chin NL. 2020. Prediction of the shelf-life of date seeds brew by integration of acceptability and quality indices. Journal of Food Measurement and Characterization 14:1158-1171. https://doi.org/10.1007/s11694-019-00365-4
19. Fikry M, Yusof YA, M Al-Awaadh A, Abdul Rahman R, Chin NL, Ghazali HM. 2019b. Antioxidative and quality properties of full-fat date seeds brew as influenced by the roasting conditions. Antioxidants 8:226.
20. Ghnimi S, Almansoori R, Jobe B, Hassan M, Afaf K. 2015. Quality evaluation of coffee-like beverage from date seeds (Phoenix dactylifera, L.). Journal of Food Processing and Technology 6.
21. Golshan Tafti A, Solaimani Dahdivan N, Yasini Ardakani S. 2017. Physicochemical properties and applications of date seed and its oil. International Food Research Journal 24.
22. Habib H, Platat C, AlMaqbali F, Ibrahim W. 2014. Date seed (Phoenix dactylifera) extract reduces the proliferation of pancreatic cancer cells, DNA damage and superoxide-dependent iron release from ferritin in vitro (829.20). The FASEB Journal 28:829.820. https://doi.org/10.1096/fasebj.28.1_supplement.829.20
23. Hamzalıoğlu A, Gökmen V. 2020. 5-Hydroxymethylfurfural accumulation plays a critical role on acrylamide formation in coffee during roasting as confirmed by multiresponse kinetic modelling. Food Chemistry 318:126467. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126467
24. Herawati D, Giriwono PE, Dewi FNA, Kashiwagi T, Andarwulan N. 2019. Critical roasting level determines bioactive content and antioxidant activity of Robusta coffee beans. Food science and biotechnology 28:7-14. https://doi.org/10.1007/s10068-018-0442-x
25. Hilary S, Tomás-Barberán FA, Martinez-Blazquez JA, Kizhakkayil J, Souka U, Al-Hammadi S, Habib H, Ibrahim W, Platat C. 2020. Polyphenol characterisation of Phoenix dactylifera L. (date) seeds using HPLC-mass spectrometry

and its bioaccessibility using simulated in-vitro digestion/Caco-2 culture model. Food chemistry 311:125969. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125969
26. Hirano M, Miura M, Gomyo T. 1996. A Tentative Measurement of Brown Pigments in Various Processed Foods. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 60:877-879. https://doi.org/10.1271/bbb.60.877
27. ICO. 2021. World coffee consumption: https://ico.org/prices/new-consumption-table.pdf.
28. Juhaimi FA, Ghafoor K, Özcan MM. 2012. Physical and chemical properties, antioxidant activity, total phenol and mineral profile of seeds of seven different date fruit (Phoenix dactylifera L.) varieties. International journal of food sciences and nutrition 63:84-89. https://doi.org/10.3109/09637486.2011.598851
29. Keunchkarian S, Reta M, Romero L, Castells C. 2006. Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatogaphic conditions. Journal of Chromatography A 1119:20-28. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.006
30. Longhua X, Limin Z, Xuguang Q, Zhixiang X, Jiaming S. 2012. Determination of trace acrylamide in potato chip and bread crust based on SPE and HPLC. Chromatographia 75:269-274. https://doi.org/10.1007/s10337-012-2195-7
31. Lopes GR, Ferreira AS, Pinto M, Passos CP, Coelho E, Rodrigues C, Figueira C, Rocha SM, Nunes FM, Coimbra MA. 2016. Carbohydrate content, dietary fibre and melanoidins: Composition of espresso from single-dose coffee capsules. Food Research International 89:989-996. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.018
32. Madrau MA, Sanguinetti AM, Del Caro A, Fadda C, Piga A. 2010. Contribution of melanoidins to the antioxidant activity of prunes. Journal of Food Quality 33:155-170. https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2010.00328.x
33. Maqsood S, Adiamo O ,Ahmad M, Mudgil P. 2020. Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. Food chemistry 308:125522. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125522
34. Mastovska K, Lehotay SJ. 2006. Rapid Sample Preparation Method for LC−MS/MS or GC−MS Analysis of Acrylamide in Various Food Matrices. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:7001-7008.
35. Pastoriza S, Rufián-Henares JÁ, Morales FJ. 2012. Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems. LWT - Food Science and Technology 45:198-20.٣
36. Pérez-Hernández LM, Chávez-Quiroz K, Medina-Juárez LÁ, Gámez Meza N. 2012. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from Coffea arabica and Coffea canephora. Journal of the Mexican Chemical Society 56.٤٣٥-٤٣٠: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.004
37. Rattanarat P, Chindapan N, Devahastin S. 2021. Comparative evaluation of acrylamide and polycyclic aromatic hydrocarbons contents in Robusta coffee beans roasted by hot air and superheated steam. Food Chemistry 341:128266.
38. Samanipour B, Jalili M ,Rezaei K, Faraji R. 2019. Analysis of acrylamide from potato chips using an amino column followed by PDA as the detection system in HPLC. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods 11:411-419. https://doi.org/10.3920/QAS2018.1436
39. Şenyuva HZ, Gökmen V. 2005. Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. Food Additives and Contaminants 22:214-220.
40. Surma M, Sadowska-Rociek A, Cieślik E, Sznajder-Katarzyńska K .٢٠١٧ .Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes. Microchemical Journal 131:98-102. https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.021
41. Vignoli J, Bassoli D, Benassi MdT. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. Food chemistry 124:863-868. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.008
42. Wang H, Lee AW, Shuang S, Choi MM. 2008. SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. Microchemical Journal 89:90-97. https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.12.006
43. Wenzl T, Karasek L, Rosen J, Hellenaes K-E, Crews C, Castle L, Anklam E. 2006. Collaborative trial validation study of two methods, one based on high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and on gas chromatography–mass spectrometry for the determination of acrylamide in bakery and potato products. Journal of Chromatography A 1132:211-218. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.007
44. WHO. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some industrial chemicals 60:389-433.
45. Zhang Y, Jiao J ,Cai Z, Zhang Y, Ren Y. 2007. An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1142:194-198. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.086
46. Zheng C, Sun D-W, Zheng L. 2006. Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection–a review. Trends in Food Science & Technology 17:642-655.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 561- 573

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۷۳-۵۶۱

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

Short Research Paper

Production of nanoliposomes carrying nisin with chitosan coating and evaluation of physical and antibacterial properties of the product against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*

Soheyl Reyhani Poul[1]*- Sakineh Yeganeh[2]- Reza Safari[3]

Received: 2021.09.26
Revised: 2021.10.23
Accepted: 2021.10.26
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Reyhani Poul, S., Yeganeh, S., Safari, R. (2022). Production of nanoliposomes carrying nisin with chitosan coating and evaluation of physical and antibacterial properties of the product against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 561-573.

Abstract

Introduction: Nisin is one of the antimicrobial substances that is used today as a preservative in various foodstuffs. It is a bacteriocin comprised of 34 amino acids and a molecular weight of 3.5 Da. With all the benefits of nisin, there are barriers to its use in dairy and protein rich products. One of these barriers is the combination of nisin with fats, proteins and sugars and the consequent reduction of its antibacterial activity. In the food science and industry, the use of the technique of encapsulation and production of liposome is the best possible solution in such cases. Also, by adding an antimicrobial agent such as chitosan to the coating of nanoliposomes, the antibacterial activity of the product may be increased. The aim of the present research was to produce nanoliposomes carrying nisin with (and without) chitosan coating and to evaluate the physical and antibacterial properties against two gram-positive bacteria, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus.*

Materials and Methods: In this study, four treatments of nanoliposomes carrying nisin (NN), nanoliposomes carrying nisin coated with chitosan 0.05% ((NN-CH (0.05)), nanoliposomes carrying nisin coated with chitosan 0.1% (NN-CH (0.1)) and nanoliposomes carrying nisin coated with chitosan 0.5% (NN-CH (0.5)) were prepared and examined in terms of physical properties (average particle size, particle dispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency) and antibacterial activity (against two gram-positive bacteria, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* with two diffusion methods in agar medium and microdilution test). This research was conducted in a completely randomized design and SPSS and EXCEL softwares were used for statistical analysis and drawing of diagram, respectively. Data were analyzed by one-way analysis of variance and the difference between the means was evaluated by Duncan's test at 95% confidence level.

Results and Discussion: The results showed that the average particle sizein different treatments with each other are significantly different ($P<0.05$) and vary from about 110 to 327nm; Also as the amount of chitosan in the coating increased, the particle size increased ($P<0.05$). This indicates the successful binding of chitosan to the surface of the nanoliposome, which results in the formation of a layer around the nanoliposome and an increase in particle size. Particle dispersity index was recorded less than 0.3 in all treatments and was not related to the amount of chitosan in the coating. With increasing the amount of chitosan in the coating of nanoliposomes, zeta potential increased significantly

1. Former PhD Student, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran.
3. Assistant Professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Sari, Iran.
(*Corresponding Author Email: soheylreyhani@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72715.1097

(P<0.05). This index changed from -55.34 in NN treatment to 53.14 mV in NN-CH (0.5) treatment. In fact, chitosan as a cationic polysaccharide changes the potential to positive values. As the amount of chitosan in coating of nanoliposomes increased, the encapsulation efficiency increased significantly in the treatments (P<0.05); this index increased from 32.19% in NN treatment to 75.14% in NN-CH (0.5) treatment. The results of the antibacterial activity of nisin in two methods of diffusion in agar medium and microdilution test showed that its antibacterial activity increased with nanoencapsulation of nisin with (and without) chitosan coating (p<0.05). Also, with the increase in chitosan concentration, the antibacterial activity of carrier nanoliposomes increased and the highest antibacterial activity was recorded in NN-CH (0.5) treatment (p<0.05). The diameter of the non-growth halo of *Bacillus cereus* against the research treatments (with five concentrations of 2.5 to 25 µg/ml) varied from about 4.5 to 17.5 mm. This amount for *Staphylococcus aureus* was recorded from 2.1 to 26.5 mm. By increasing the concentration of nisin and carrier nanoliposomes, the diameter of the halo of non-growth of both bacteria increased significantly (p<0.05). But an exception was recorded in this case; The diameter of the non-growth halo for *Staphylococcus aureus* in two concentrations of 2.5 and 5 µg/ml of treatments was the same and had no significant difference (p>0.05). The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the examined treatments for *Bacillus cereus* were in the range of 100 to 400 and 200 to 500 µg/ml, respectively. These two concentrations for *Staphylococcus aureus* were recorded as 50 to 200 and 100 to 400 µg/ml respectively. Based on the values of diameter of non-growth halo, MIC and MBC it can be claimed that *Bacillus cereus* is more resistant to the examined treatments than *Staphylococcus aureus*.

Nanoencapsulation of nisin in the form of carrier nanoliposomes with chitosan coating is a suitable solution to improve its physical and antibacterial properties. In such a way that by increasing the concentration of chitosan in the coating, both of the aforementioned properties improved significantly. Nanoliposomes carrying nisin with (and without) chitosan coating have the ability to inhibit the growth and killing *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The antibacterial activity increases with the increase in nisin and carrier nanoliposomes concentrations. The value of non-growth halo, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration confirm that *Bacillus cereus* is more resistant to nisin and its carrier nanoliposomes than *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Nisin, Nanoliposome, Chitosan, Physical properties**,** Antibacterial activity.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 561- 573

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۷۳-۵۶۱

مقاله کوتاه علمی-پژوهشی

تولید نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با پوشش کیتوزان و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی محصول علیه *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus*

سهیل ریحانی پول[1*]- سکینه یگانه[2]- رضا صفری[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۴

چکیده

از آنجا که فعالیت ضدباکتریایی نایسین در واکنش با پروتئین‌ها، قندها و لیپیدها کاهش می‌یابد، نانوریزپوشانی این نگهدارنده جهت حفاظت از خواص ذاتی آن راه حل مناسبی به‌نظر می‌رسد. هدف تحقیق حاضر تولید نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با (و بدون) پوشش کیتوزان و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی محصول بود. به همین منظور چهار تیمار شامل NN (نانولیپوزوم‌های حامل نایسین)، NN-CH (0.05)، NN-CH (0.1) و NN-CH (0.5) (نانولیپوزوم‌های حامل نایسین به‌ترتیب با پوشش‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد کیتوزان) طراحی و مورد آزمون‌های مختلف قرار گرفتند. نتایج نشان داد میانگین سایز ذرات در تیمارهای مختلف از حدود ۱۱۰ تا ۳۲۷ نانومتر متغیر است؛ ضمن اینکه با افزایش میزان کیتوزان در پوشش، ذرات بزرگتر شدند (P<۰/۰۵). شاخص توزیع اندازه ذره‌ای در تیمارها کمتر از ۰/۳ ثبت شد و ارتباطی با میزان کیتوزان در پوشش نداشت. با افزایش میزان کیتوزان اطراف نانولیپوزوم‌ها، پتانسیل زتا به صورت معنی داری افزایش (P<۰/۰۵) و از ۵۵/۳۴- در تیمار NN به ۵۳/۱۴ میلی‌ولت در تیمار NN-CH (0.5) ارتقا یافت. همچنین راندمان ریزپوشانی نیز به صورت معنی داری بیشتر شد و از ۳۲/۱۹ در تیمار NN به ۷۵/۱۴ درصد در تیمار NN-CH (0.5) تغییر کرد (P<۰/۰۵). مطابق نتایج فعالیت ضدباکتریایی نایسین در دو روش انتشار در محیط کشت آگار و رقیق‌سازی در لوله، با نانوریزپوشانی نایسین با (و بدون) پوشش کیتوزان، فعالیت ضدباکتریایی آن بیشتر شد (P<۰/۰۵). همچنین با افزایش غلظت کیتوزان، فعالیت ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های حامل افزایش یافت و بیشترین حد آن در تیمار NN-CH (0.5) ثبت گردید (P<۰/۰۵). قطر هاله عدم رشد *باسیلوس سرئوس* در برابر تیمارهای تحقیق (با پنج غلظت ۲/۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از حدود ۴/۵ تا ۱۷/۵ میلی‌متر متغیر بود. این میزان برای *استافیلوکوکوس اورئوس* حدود ۲/۱ تا ۲۶/۵ میلی‌متر ثبت شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تیمارهای تحقیق برای *باسیلوس سرئوس* به‌ترتیب در بازه ۱۰۰ تا ۴۰۰ و ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشت. این دو غلظت برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب ۵۰ تا ۲۰۰ و ۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت گردید. مطابق یافته‌ها، نانوریزپوشانی نایسین در قالب نانولیپوزوم‌های حامل با پوشش کیتوزان موجب ارتقای خواص فیزیکی و ضدباکتریایی آن می‌شود.

واژه‌های کلیدی: نایسین، نانولیپوزوم، کیتوزان، خواص فیزیکی، فعالیت ضدباکتریایی.

مقدمه

نایسین که امروزه به صورت گسترده در فراورده‌های غذایی به عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود، در حقیقت نوعی باکتریوسین است که دارای ۳۴ اسیدآمینه و وزن مولکولی معادل ۳/۵ کیلودالتون می‌باشد. باکتری‌های *لاکتوکوس لاکتیس*[4] این ترکیبات را به‌منظور حفظ بقا و پیروزی در رقابت بر سر منابع تولید می‌کنند (Da Silva et al., 2010; Hamidi et al., 2012). باکتریوسین‌ها که دارای ماهیت پپتیدی یا پروتئینی ضدمیکروبی هستند (Chollet et al., 2008) به دلیل مقاومت در برابر دماهای بالا و پائین، اسیدیته بالا، نمک‌ها، آنزیم‌ها و حلال‌های آلی ضعیف، قابلیت استفاده در فراورده‌های غذایی مختلف را دارا می‌باشند (Cheikh et al., 2008; Zaerzadeh et al., 2011). نایسین معروف‌ترین باکتریوسینی است که هم از نظر علمی و هم از نظر اقتصادی بسیار مورد توجه است. به گونه‌ای که سازمان و غذا و داروی ایالات متحده بیش از ۲۲ سال

۱- دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۳- استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: soheylreyhani@gmail.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72715.1097

4 *Lactococcus lactis*

قبل و پس از آن اتحادیه اروپا آن را به‌عنوان نگهدارنده‌ای ایمن در صنایع غذایی تائید کرده است. به همین دلیل امروزه در بیش از ۵۰ کشور دنیا، این ماده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

از دیگر نگهدارنده‌هایی که استفاده از آن در مواد غذایی به خصوص فراورده‌های شیلاتی مورد بحث و تحقیق است، کیتوزان می‌باشد (Nowzari et al., 2013; Ojagh et al., 2010; Alboghbeish and Khodanazari, 2017; Reyhani Poul and Jafarpour, 2020). کیتوزان پلیمر کربوهیدراتی است که در نتیجه حذف گروه استیل از کیتین حاصل می‌شود و اثرات ضدمیکروبی آن تائید شده است (No et al., 2003). در تحقیقاتی هم استفاده از کیتوزان جهت پوشش نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فعال به‌منظور بهبود خواص فیزیکی و پایداری محصول گزارش شده است (Bang and Reyhani Poul, 2021; Li et al., 2015; Hasani et al., 2018; Yeganeh et al., 2011). با همه مزایای نایسین، موانعی در راه اثربخشی و استفاده از آن به فرم آزاد در فراورده‌های لبنی و پروتئینی وجود دارد. یکی از این موانع ترکیب نایسین با چربی، پروتئین و قندها و متعاقبا کاهش فعالیت ضدباکتریایی آن است. در علوم و صنایع غذایی در چنین مواقعی استفاده از تکنیک کپسوله کردن و تولید لیپوزوم بهترین راهکار ممکن است (Benech Laridi et al., 2003 et al., 2002). همچنین پوشش لیپوزوم‌ها با یک ترکیب ضدمیکروب مانند کیتوزان، احتمالا بر فعالیت ضدباکتریایی محصول می‌افزاید (Reyhani Poul and Jafarpour, 2020).

لیپوزوم‌ها ویزیکول‌های کلوئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها هستند که در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دولایه‌ای ایجاد می‌کنند (Ghorbanzadeh et al., 2017). این ساختارها اولین بار در اواسط دهه ۱۹۶۰ معرفی شدند. لیپوزوم‌ها دارای دم آبگریز و ناحیه سر آب دوست هستند. هنگامی که دو غشای منفرد به هم نزدیک می‌شوند، دم‌های آبگریز به یکدیگر جذب می‌شوند، در حالی که سر آب دوست هر دو غشا به سمت آب قرار می گیرند. این فرایند، لایه مضاعف یا دو تایی کروی از مولکول‌های فسفولیپید را تشکیل می‌دهد. این کره فسفولیپیدی می‌تواند محلول‌های آبی را درون خود نگه داشته و حمل کند. لیپوزوم‌ها خاصیت آمفیفیلیک (دوگانه‌دوستی) دارند؛ لذا قادر به کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب‌دوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیل هستند (Hasani et al., 2018). این خاصیت موجب می‌شود تا لیپوزوم‌ها بتوانند هر دو اسیدهای آمینه‌های قطبی و غیرقطبی را کپسوله کنند (Sadeghian et al., 2019). انواع مختلفی از ترکیبات زیست فعال آب‌دوست از جمله مولکول‌های کوچک و یون‌ها (نمک‌ها، قندها و پپتیدها)، پلیمرهای زیستی (پروتئین و پلی‌ساکاریدها) و ذرات (قطرات چربی، نانوذرات و پروبیوتیک‌ها) می‌توانند از طریق فاز آبی لیپوزوم‌ها حمل شوند. تاکنون در مطالعات مختلف، ترکیبات و عناصر مختلفی از جمله ویتامین‌های C، A، D و E، کارتنوئیدها، کوآنزیم کیو۱۰، آهن و کلسیم در سیستم‌های مبتنی بر لیپوزوم کپسوله شده‌اند (Xia et al., 2006, Tan et al., 2013). نانولیپوزوم‌ها همان لیپوزوم‌هایی با اندازه کوچکتر هستند که از نظر ساختاری و شیمیایی با لیپوزوم‌ها یکسان هستند. در صنایع غذایی از نانولیپوزوم‌ها جهت حفاظت از ترکیبات مختلف مانند نگهدارنده‌های ضدمیکروبی و قارچی و همچنین پپتیدهای زیست فعال استفاده می‌شود (Yeganeh and Reyhani Poul, 2021). همچنین نانولیپوزوم‌ها برای کپسوله کردن برخی طعم‌دهنده‌ها و آنزیم‌ها با هدف رهایش تدریجی آن‌ها در محصولات غذایی نیز به‌کار می‌روند. ریزپوشانی آنزیم‌ها در نانولیپوزوم‌ها موجب کاهش از دست‌رفتن فعالیت آنزیم در شرایط شبیه‌سازی شده معده می‌شود (Hsieh et al., 2002). کپسوله کردن ترکیبات فنولی با نانولیپوزوم، پایداری آن‌ها را بهبود می‌دهد (Fang et al., 2010). نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها به‌واسطه اندازه کوچکتر (در حد نانو) سطح بیشتری را فراهم می‌کنند که این مورد موجب افزایش حلالیت، دسترسی زیستی مطلوب‌تر، بهبود شرایط آزادسازی کنترل شده و پایداری کلوئیدی بالاتر محتوی می‌شود. همچین اندازه بسیار کوچک نانولیپوزوم نسبت به لیپوزم از ایجاد کدورت در صورت استفاده در محلول‌ها جلوگیری می‌کند (Rasti et al., 2012). هدف تحقیق حاضر نانو ریزپوشانی نایسین با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم- کیتوزان و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی (فعالیت مهار باکتری‌های شاخص مواد غذایی) است.

مواد و روش‌ها

نایسین مورد استفاده در تحقیق حاضر (Valisin، Mayasan، ترکیه)، گلیسرول (با خلوص ۸۰ درصد) و کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (با درجه داستیلاسیون ۸۵- ۷۵ درصد) از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. همچنین فسفولیپید (لیپوید، درجه خلوص ۹۹ درصد، سیگما، آلمان) خریداری گردید. به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی محصول از دو باکتری شاخص مواد غذایی یعنی *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد که از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شدند. همچنین محیط کشت آگار مغذی و آبگوشت مغذی از شرکت بیولب هندوستان تهیه گردیدند.

تهیه نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با پوشش کیتوزان

نایسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و فسفولیپید/کلسترول در آب مقطر حل شدند. این محلول پس از اختلاط با گلیسرول تا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارات داده شد. pH مخلوط با استفاده از

سود ۲ مولار (در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد و شیکر به مدت ۱ ساعت) به ۷/۳ رسانده شد. لیپوزوم‌های خام تحت فشار بالا هموژن شده و با نسبت‌های مختلفی از محلول کیتوزان (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد وزنی/ حجمی) مخلوط شدند (در دمای اتاق به مدت یک ساعت و با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه). لازم به ذکر است که محلول کیتوزان با حل کردن کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد وزنی/ وزنی تهیه شد. در مرحله بعد، محلول لیپوزومی در دمای اتاق با سونیکاتور (با پروپ ۲۰۰ یوپی‌اس) تحت سونیکاسیون قرار گرفت. نهایتا محصول تولیدشده در دمای محیط در معرض گاز نیتروژن نگهداری شدند (Rasti et al., 2012). تیمارهای تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- تیمارهای تحقیق

Table 1- Research treatments

Treatments	Contents
NN	Nanoliposomes carrying nisin (no chitosan)
NN-CH (0.05)	Nanoliposomes carrying nisin with 0.05% (W/V) chitosan coating
NN-CH (0.1)	Nanoliposomes carrying nisin with 0.1% (W/V) chitosan coating
NN-CH (0.5)	Nanoliposomes carrying nisin with 0.5% (W/V) chitosan coating

ارزیابی خواص فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل نایسین

میانگین سایز ذرات، شاخص توزیع اندازه ذره‌ای[1] و پتانسیل زتا

شاخص‌های اندازه ذره‌ای و پراکندی ذرات پس از رقیق کردن نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات نمکی (PBS) به روش تفرق نور پویا[2] با استفاده از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، Malvern، انگلستان، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض ۰/۰۱ متر) اندازه‌گیری شدند. به‌منظور اندازه‌گیری پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها، از دستگاه زتاسایزر استفاده شد. در این روش نانولیپوزوم‌ها با استفاده از ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH= ۷/۴) به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. ارزیابی پتانسیل زتا در زاویه ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۶۳۳ نانومتر هلیوم- تنگستن (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد (Hasani et al., 2018).

بازده ریزپوشانی

جهت محاسبه بازده فرایند ریزپوشانی، در مرحله اول ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۱۲۰۰ میکرولیتر بافر وارد اپندورف تیوپ شد. سپس این مخلوط با دور سریع ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ و سوپرناتانت جداسازی گردید. در مرحله بعد، میزان پروتئین در فاز زیرین (رسوب) با استفاده از کیت اندازه‌گیری پروتئین پروگالول رد[3] مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئین‌ها در حضور پروگالول رد و مولبدات کمپلکس قرمزی تشکیل می‌دهند که این رنگ توسط دستگاه اتوآنالیزور قابل اندازه‌گیری است. نهایتا بازده ریزپوشانی با استفاده از رابطه زیر محاسبه و به صورت درصد بیان شد (Watanabe et al., 1986, Zaerzadeh et al., 2011).

(۱) ۱۰۰ × (میزان اولیه نایسین / میزان نایسین اندازه‌گیری شده در نانولیپوزوم) = بازده ریزپوشانی (٪)

بررسی خواص ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های حامل نایسین

به‌منظور ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی تیمارهای تحقیق از ۵ غلظت ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دو روش انتشار در محیط کشت آگار و رقیق‌سازی در لوله[4] و دو گونه *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد.

شرایط کشت باکتری‌های مورد استفاده

محیط کشت مورد استفاده به‌منظور آماده‌سازی باکتری‌ها، آبگوشت اینفیوژن مغز و قلب گاو[5] بود. پس از کشت اولیه باکتری‌ها، نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد، جهت دستیابی به رسوب باکتریایی، محیط‌های کشت حاوی سوسپانسیون باکتری‌ها در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از خارج‌کردن مایع رویی و افزودن بافر فسفات به رسوب باقیمانده، فرآیند سانتریفوژ دو بار دیگر تکرار گردید. در هر مرحله نیز از بافر فسفات جهت خارج کردن اثرات محیط آبگوشت اولیه استفاده گردید. سپس به رسوب باقیمانده مقداری بافر فسفات اضافه و با لوله استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (معادل[8] ۱۰× ۱/۵ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر) مقایسه شد.

1 Particle Dispersity Index
2 Dynamic Light Scattering
3 Pyrogallol red
4 Microdilution test
5 Brain Heart Infusion broth

نهایتا با رقیق‌سازی نمونه‌ها، رقت ۱×۱۰^{۶} به‌منظور انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرارگرفت (Sarada et al., 1999).

روش انتشار در محیط کشت آگار

در این روش، ابتدا سوسپانسیون تهیه‌شده از باکتری‌ها به صورت سطحی بر روی محیط کشت مولر هینتون[1] آگار کشت داده شد. در مرحله بعد، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در سطح محیط تعبیه و مقدار ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ ، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تیمارها به چاهک‌ها منتقل گردید. سپس نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک با استفاده ار خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید. از آنتی‌بیوتیک داکسی سیلین[2] (۳۰ میلی‌گرمی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Sitohy et al., 2015, Safari et al., 2018).

روش رقیق‌سازی در لوله

به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی تیمارهای تحقیق با روش رقیق‌سازی، رقت‌های مورد استفاده، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم بودند که به همراه ۱ میلی‌لیتر از محیط آبگوشت اینفیوژن قلب و مغز گاو به لوله آزمایش منتقل شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های مورد مطالعه به لوله‌ها اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. به‌منظور بررسی تغییرات حاصله، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. مانند روش قبلی، آنتی‌بیوتیک داکسی‌سیلین نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در این روش، غلظتی از سوسپانسیون میکروبی که کمترین جذب نوری را نشان داد به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده باکتری[3] و غلظتی از سوسپانسیون که بعد کشت ۲۴ ساعته، فاقد رشد کلنی در محیط کشت بود نیز به‌عنوان کمترین غلظت کشنده باکتری[4] تعیین شد (Safari et al., Sitohy et al., 2015 ; 2018).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا و به‌منظور آنالیز آماری و رسم اشکال به‌ترتیب از نرم‌افزارهای SPSS و EXEL استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه آنالیز شدند و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

میانگین اندازه ذرات

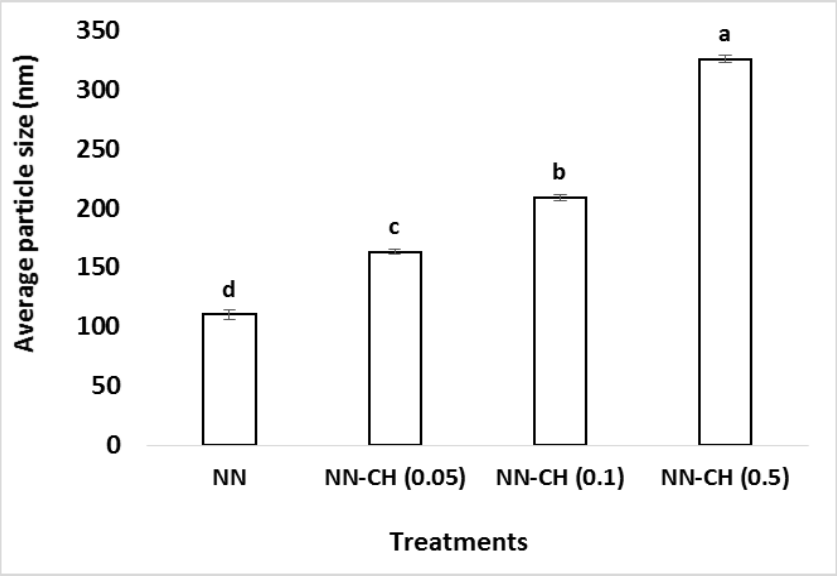
اندازه ذرات یکی از مهم‌ترین خواص فیزیکی سیستم‌های پوششی بر پایه نانولیپوزوم است که بر سایر ویژگی‌ها از جمله پایداری، راندمان ریزپوشانی و رهایش ترکیبات زیست‌فعال اثرگذار است (Hasani et al., 2018). شکل ۱، میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها را نشان می‌دهد. مطابق این شکل میانگین اندازه ذرات تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$) و از حدود ۱۱۰ تا ۳۲۷ نانومتر متغیر هستند. میانگین اندازه نانولیپوزوم‌ها با افزایش میزان کیتوزان در پوشش اطراف آن‌ها، افزایش یافت و بیشترین میانگین سایز ذرات در تیمار NN-CH (0.5) ثبت شد (۳/۰۸ ±۳۲۶/۱ نانومتر).

در تحقیق پیش‌رو، پوشش نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان بر میانگین اندازه ذرات به شکل معنی‌داری افزود به‌گونه‌ای که میانگین اندازه ذرات از ۱۱۰/۵ نانومتر در نانولیپوزوم فاقد پوشش به ۳۲۶/۱ نانومتر در نانولیپوزوم دارای پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد افزایش یافت. این مورد با نتایج Sadeghian و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد. تحقیق آن‌ها که به بررسی خواص نانولیپوزوم‌های حامل پروتئین آبکافت شده دانه کینوآ پرداخت، گزارش کرد میانگین اندازه ذرات از ۴۰ نانومتر در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش به ۷۰ نانومتر در نانولیپوزوم‌های دارای پوشش کیتوزان افزایش یافت (Sadeghian et al., 2019). همچنین در پژوهش دیگری که پپتیدهای آنتی‌اکسیدان حاصل از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در قالب نانولیپوزوم کپسوله شدند، با افزایش میزان کیتوزان در اطراف نانولیپوزوم‌ها، ذرات به شکل معنی‌داری بزرگتر شدند؛ به‌گونه‌ای که میانگین اندازه آن‌ها از ۱۶۳/۴ نانومتر در نمونه‌های فاقد پوشش به ۲۳۴ نانومتر در تیمارهای داری پوشش کیتوزان یک درصد افزایش یافت (Ramezanzade et al., 2017). علت افزایش سایز ذرات تیمارها با افزودن کیتوزان، اتصال موفقیت‌آمیز کیتوزان به سطح نانولیپوزوم‌ها است که موجب شکل‌گیری لایه‌ای بر سطح ذرات و افزایش ضخامت و سایز آن‌ها می‌شود (Henriksen et al., 1994). البته در تحقیقاتی هم پوشش نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان موجب کاهش اندازه ذرات شده است (Bang et al., 2014, Hasani et al., 2018). Bang و همکاران (۲۰۱۴) علت این پدیده را نیروی انقباض ناشی از مقاومت یونی بین نانولیپوزوم‌های حامل و پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان بیان کردند؛ به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت کیتوزان، نیروی انقباضی افزایش

---

[1] Muller-Hinton Agar
2 Doxycycline
3 Minimal Inhibitory Concentration (MIC)
4 Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

می‌یابد و موجب کاهش بیشتر در اندازه ذرات می‌گردد (Bang et al., 2014).

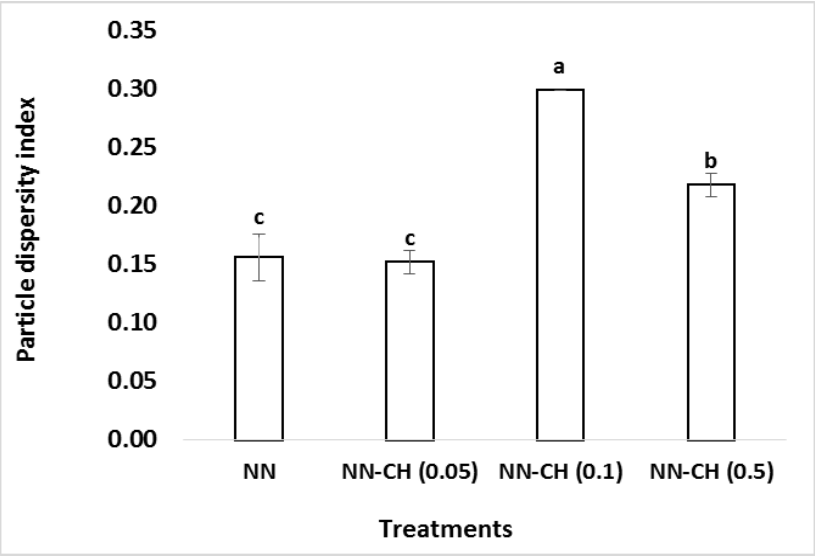


شکل ۱- میانگین سایز ذرات تیمارهای تحقیق

Fig. 1. Average particle size of research treatments

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters indicates a significant difference between the data (p<0.05).



شکل ۲- شاخص توزیع اندازه ذره‌ای تیمارهای تحقیق

Fig. 2. Particle dispersity index of research treatments

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters indicates a significant difference between the data (p<0.05).

شاخص توزیع اندازه ذره‌ای

شاخص توزیع اندازه ذره‌ای یکی دیگر از خواص فیزیکی نانولیپوزوم‌ها است که نشان‌دهنده حد و میزان یکنواختی سیستم‌های کلوئیدی می‌باشد. مقادیر بالای این شاخص بیانگر وجود ذرات و توده‌های درشت و غیریکنواخت در سیستم است (Romero-Pérez et al., 2010). در شکل ۲ شاخص توزیع اندازه ذره‌ای نانولیپوزوم‌ها ارائه شده است. مطابق این شکل شاخص مذکور از حدود ۰/۱۵۶ تا ۰/۳ در تیمارها متفاوت و بیشترین میزان آن (۰/۰۰ ±۰/۲۹۹) در

تیمار (0.1) NN-CH ثبت شد. این شاخص در تیمارهای NN و (0.05) NN-CH فاقد اختلاف معنی‌داری بود (P>۰/۰۵). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، رابطه معنی‌داری بین میزان کیتوزان در پوشش‌ها و شاخص مذکور وجود ندارد. میزان شاخص توزیع اندازه ذره‌ای در تیمارهای تحقیق حاضر کمتر از ۰/۳ است که نشان‌دهنده یکنواختی توزیع ذرات است. شاخص توزیع اندازه ذره‌ای در تحقیقی که پپتیدهای حاصل از کلاژن ماهی[1] در سیستم نانولیپوزومی کپسوله شده بود، ۰/۲۵ گزارش شد (Mosquera et al., 2014). در تحقیقی که پپتیدهای آنتی‌اکسیدان حاصل از عضله و محصولات جانبی ماهی کروکر[2] با استفاده از فسفاتیدیل کولین در ساختار لیپوزوم ریزپوشانی شدند، شاخص توزیع اندازه ذره‌ای در تیمارها کمتر از ۰/۳ ثبت شد (Zavareze et al., 2014).

پتانسیل زتا

پتانسیل زتا یکی دیگر از خواص فیزیکی سیستم‌های کلوئیدی و بهترین شاخص از وضعیت الکتریکی سطحی این سیستم‌ها است. در واقع پتانسل زتا تعیین کننده ویژگی الکترواستاتیک نانولیپوزوم‌ها و نشان‌دهنده بار کلی ذره در یک محیط مایع می‌باشد (Sadeghian et al., 2019). شکل ۳ پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها را نشان می‌دهد. مطابق این شکل، میزان این شاخص در نانولیپوزوم‌ها (تیمارها) از حدود ۵۵- تا ۵۴+ متغیر است. با افزایش مقدار کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، پتانسیل زتای سطح ذرات به شکل معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بیشترین سطح این شاخص در تیمار NN-CH (0.5) ثبت شد (۳/۲۵ ±۵۳/۱۴ میلی‌ولت).

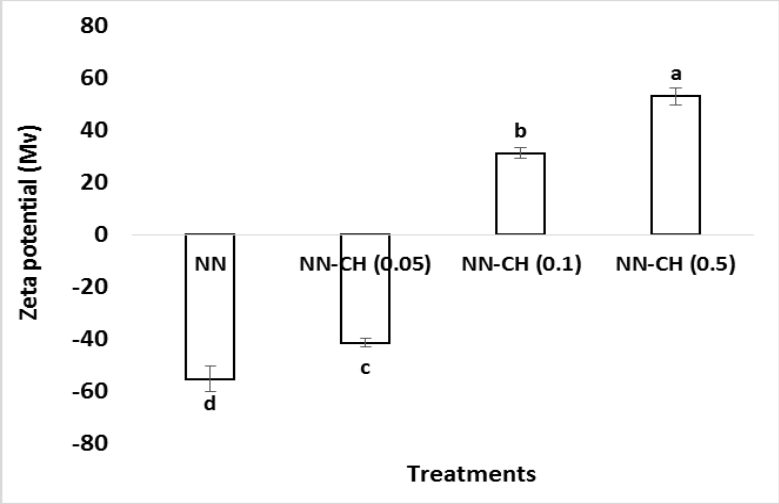
پتانسل زتا تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب ذرات، محیط پراکنش، pH و قدرت یونی در محلول تغییر می‌کند (Zavareze et al., 2014). این شاخص نمایانگر میزان تجمیع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره و در نتیجه میزان پایداری الکترواستاتیک سیستم است (Hasani et al., 2018). اگر پتانسیل زتا به کمتر از مقدار بحرانی کاهش یابد، لایه دوگانه اطراف ذرات تخریب و متعاقبا تجمیع ذرات (توده‌ای شدن) اتفاق می‌افتد. اما اگر پتانسیل زتا به مقادیر استاندارد (ذراتی که پتانسل زتای آن‌ها بیشتر از ۳۰+ و یا کمتر از ۳۰- باشد، بیشترین پایداری را دارند) ارتقا یابد، ذرات همدیگر را دفع می‌کنند که این امر مانع از توده‌ای شدن می‌گردد. به همین دلیل ارزیابی پتانسل زتا در کنترل توده‌ای شدن و رسوب نانولیپوزوم‌های حامل ترکیبات فعال و در نتیجه پایداری سیستم مفید و مهم است (Mozafari et al., Hasani et al., 2018, 2006). در تحقیق حاضر با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، پتانسیل زتا به صورت معنی‌داری افزایش یافت و از ۵۵/۳۴- میلی‌ولت در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش به ۵۳/۱۴ میلی‌ولت در تیمار دارای پوشش ۰/۵ درصد کیتوزان تغییر کرد. این مورد با نتایج تحقیق Ramezanzade و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت دارد. در پژوهش مذکور پتانسل زتا از ۳/۹+ میلی‌ولت در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش کیتوزان (حامل پپتید) به ۴۵/۵ میلی‌ولت در نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان ۱ درصد ارتقا یافت. این موارد نشان می‌دهد که کیتوزان به‌عنوان یک پلی‌ساکارید کاتیونی قادر است پتانسیل زتا را به سمت مقادیر مثبت سوق دهد (Sadeghian et al., 2019).

بازده ریزپوشانی

بازده ریزپوشانی که نشان‌دهنده قدرت نانولیپوزوم در جلوگیری از خروج محتویات خود (هسته درونی) است، یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها در تعیین سطح پایداری (فیزیکی) ترکیبات کپسوله‌شده است (Hasani et al., 2018). همچنین این شاخص، سایر خصوصیات نانولیپوزوم‌ها از جمله پایداری اکسیداتیو، مورفولوژی و میزان رهایش را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (Drusch et al., 2012). شکل ۴ بازده فرایند ریزپوشانی تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. مطابق این شکل هر چهار تیمار از نظر شاخص مذکور اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵). با افزایش میزان کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، بازده ریزپوشانی به صورت معنی‌داری در تیمارها بیشتر شد (P<۰/۰۵)؛ به گونه‌ای که این شاخص از ۳۲/۱۹ درصد در تیمار نانولیپوزوم فاقد پوشش (NN) به ۷۵/۱۴ درصد در تیمار نانولیپوزوم پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان ۰/۵ درصد ((0.05) NN-CH) افزایش یافت. در سایر تحقیقات نیز نتیجه مشابهی گزارش شد (Zavareze et al., 2014; Liu et al., 2015). در تحقیقی که پپتید حاصل از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در قالب نانولیپوزوم کپسوله شد، افزایش میزان کیتوزان در پوشش به ۰/۲ و ۰/۴ درصد موجب افزایش راندمان ریزپوشانی شد؛ به‌گونه‌ای که شاخص مذکور از ۶۸/۵ درصد در تیمارهای فاقد پوشش به‌ترتیب به ۷۳/۵ و ۸۰/۲ درصد در تیمارهای پوشش‌دار ارتقا یافت. اما وقتی میزان کیتوزان به ۰/۸ و ۱ درصد افزایش داده شد، روند کاهشی بازده ریزپوشانی ثبت گردید (Ramezanzade et al., 2017).

---

1 *Bream scales*
2 *Micropogonias furnieri*

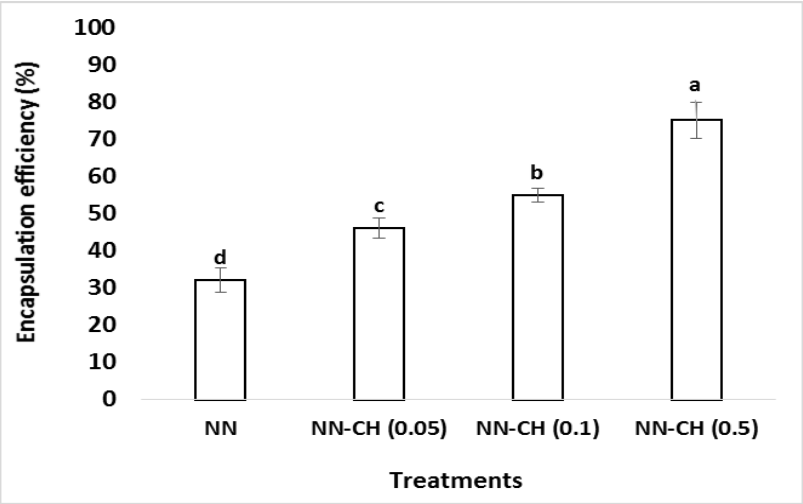


شکل ۳- پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها

Fig. 3. Zeta potential of nanoliposomes

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters indicates a significant difference between the data (p<0.05).



شکل ٤- بازده ریزپوشانی تیمارهای تحقیق

Fig. 4. Encapsulation efficiency of research treatments

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters indicates a significant difference between the data (p<0.05).

فعالیت ضدباکتریایی تیمارها

انتشار در محیط کشت آگار (قطر هاله عدم رشد)

جدول ۲ و ۳، قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را در برابر تیمارهای تحقیق (با پنج غلظت) نشان می‌دهند. مطابق این جداول، با نانو ریزپوشانی نایسین (تیمار NN)، قطر هاله عدم رشد هر دو باکتری به صورت معنی‌داری افزایش یافته است (P<۰/۰۵). به این معنی که نانولیپوزوم‌های حامل نایسین (بدون پوشش کیتوزان) فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به نایسین خالص دارند. این یافته موید آن است که تکنیک نانوریزپوشانی نایسین با پوشش نانولیپوزوم در افزایش فعالیت ضدباکتریایی این نگهدارنده دارای قابلیت مثبتی است. به‌طور کلی تکنیک نانوریزپوشانی در افزایش فعالیت ضدباکتریایی ترکیبات فعال موثر است. در تحقیقی که فیکوسیانین (که یک رنگدانه ضدباکتریایی است) مستخرج از میکروجلبک اسپیرولینا[1] با پوشش

1 *Spirulina platensis*

مالتودکسترین-کازئینات سدیم نانوریزپوشانی شد، چنین نتیجه‌ای تائید گردید (Safari et al., 2018).

همانطور که در جدول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، با اضافه شدن کیتوزان به نانولیپوزوم‌ها، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها نسبت به تیمار NN به صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر شد (P<۰/۰۵)؛ ضمن اینکه در تیمارهای دارای پوشش کیتوزان، با افزایش غلظت این پوشش پلی‌ساکاریدی، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها نیز افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها مربوط به تیمار NN-CH (0.5) بود. مطابق یافته‌ها، اختلاف دو تیمار NN-CH (0.05) و NN-CH (0.1) در این زمینه معنی‌دار نیست (P>۰/۰۵). نتایج این بخش نشان می‌دهد که کیتوزان به‌عنوان یک پلی‌ساکارید ضدمیکروب (Paomephan et al., 2018) در ترکیب با نایسین (نانولیپوزوم‌های حامل)، می‌تواند فعالیت ضدباکتریایی آن را ارتقا دهد. نتایج تحقیقی که طی آن پپتیدهای زیست فعال میگو با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم- کیتوزان نانوریزپوشانی شدند (Yeganeh and Reyhani Poul, 2021) نشان داد که نانوریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال با پوشش منفرد نانولیپوزوم، فعالیت مهارکنندگی پپتیدها را ارتقا نمی‌دهد که این یافته بر خلاف نتیجه تحقیق حاضر است. اما پژوهش پیش رو از جهت افزایش فعالیت ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش، با تحقیق مذکور همخوانی دارد.

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در برابر نانولیپوزوم‌های حامل نایسین (میلی‌متر)

Table 2- Diameter of the non-growth halo of *Bacillus cereus* bacteria against nanoliposomes carrying nisin (mm)

Treatments	Concentrations (µg/ml)					Positive control
	2.5	5	10	20	25	Doxycycline
N	R	R	3.56±0.08^{Cd}	6.72±0.15^{Bd}	9.43±0.29^{Ad}	
NN	R	R	4.82±0.11^{Cc}	8.36±0.14^{Bc}	11.25±0.55^{Ac}	
NN-CH (0.05)	R	4.56±0.12^{Db}	6.58±0.19^{Cb}	9.98±0.37^{Bb}	14.74±0.36^{Ab}	23.11±0.37
NN-CH (0.1)	R	4.64±0.15^{Db}	6.73±0.1^{Cb}	10.15±1.04^{Bb}	14.97±0.11^{Ab}	
NN-CH (0.5)	R	7.48±0.24^{Da}	8.62±0.21^{Ca}	12.87±0.42^{Ba}	17.11±0.38^{Aa}	

R= Resistance

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در سطر و ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different uppercase and lowercase letters in rows and columns, respectively, indicate significant differences between the data (p<0.05).

جدول ۳- قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر نانولیپوزوم‌های حامل نایسین (میلی‌متر)

Table 3- Diameter of the non-growth halo of *Staphylococcus aureus* bacteria against nanoliposomes carrying nisin (mm)

Treatments	Concentrations (µg/ml)					Positive control
	2.5	5	10	20	25	Doxycycline
N	2.14±0.06^{Dd}	2.25±0.1^{Dd}	5.76±0.12^{Cd}	8.46±0.11^{Bd}	12.81±0.77^{Ad}	
NN	3.11±0.12^{Dc}	3.12±0.04^{Dc}	7.39±0.24^{Cc}	11.85±0.82^{Bc}	14.47±0.63^{Ac}	
NN-CH (0.05)	3.96±0.19^{Db}	3.99±0.21^{Db}	10.35±0.43^{Cb}	14.31±1.06^{Bb}	19.12±1.23^{Ab}	31.11±0.37
NN-CH (0.1)	4.11±0.83^{Db}	4.11±0.57^{Db}	10.69±0.56^{Cb}	14.55±0.74^{Bb}	19.25±0.94^{Ab}	
NN-CH (0.5)	6.43±0.1^{Da}	6.61±0.25^{Da}	12.81±0.64^{Ca}	18.11±1.01^{Ba}	26.34±1.01^{Aa}	

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در سطر و ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different uppercase and lowercase letters in rows and columns, respectively, indicate significant differences between the data (p<0.05).

مطابق جدول ۲ و ۳، قطر هاله عدم رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در پنج غلظت از حدود ۴/۵ تا ۱۷/۵ میلی‌متر متغیر است. این میزان برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حدود ۲/۱ تا ۲۶/۵ میلی‌متر بود. مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف تیمارها نشان داد که با افزایش غلظت، فعالیت ضدباکتریایی (تیمارها) به‌صورت معنی‌داری بیشتر می‌شود (P<۰/۰۵). البته استثناهایی هم در این زمینه وجود دارد. قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در دو غلظت ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمارهای تحقیق یکسان و فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P>۰/۰۵). در ادامه مشخص شد، باکتری *باسیلوس سرئوس* در برابر غلظت ۲/۵

میکروگرم بر میلی‌لیتر همه تیمارهای تحقیق مقاوم است. این مقاومت در برابر نایسین خالص (تیمار N) و نانولیپوزوم‌های حامل آن (بدون پوشش کیتوزان یا تیمار NN) در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز ثبت شد. اما چنین مقاومتی در هیچ کدام از غلظت‌های نانولیپوزوم‌های حامل برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش نشد. با توجه به این یافته‌ها می‌توان ادعا کرد که مقاومت *باسیلوس سرئوس* در برابر نایسین و نانولیپوزوم‌های حامل آن با (بدون) پوشش کیتوزان بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* است.

رقیق‌سازی در لوله (MIC و MBC)

مطابق جدول ۴، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نایسین و نانولیپوزوم‌های حامل آن با (بدون) پوشش کیتوزان برای باکتری *باسیلوس سرئوس* به‌ترتیب در بازه ۱۰۰ تا ۴۰۰ و ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار دارد. این دو غلظت برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب ۵۰ تا ۲۰۰ و ۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت شدند. نتایج فعالیت ضدباکتریایی به روش رقیق‌سازی در لوله نشان داد که مقادیر MIC و MBC برای باکتری *باسیلوس سرئوس* در سطح بالاتری نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* قرار دارند. بنابراین یافته‌های این بخش هم، مانند قطر هاله عدم رشد موید آن است که باکتری *باسیلوس سرئوس* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر تیمارهای تحقیق از مقاومت بیشتری برخوردار است. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، با نانوریزپوشانی نایسین با پوشش منفرد نانولیپوزوم (تیمار NN)، MIC و MBC این تیمار (نسبت به نایسین خالص یا تیمار N) برای باکتری *باسیلوس سرئوس* کاهش یافت اما چنین کاهشی در مورد استافیلوکوکوس اورئوس ثبت نشد. همچنین در مورد هر دو باکتری، MIC و MBC دو تیمار NN-CH (0.05) و NN-CH (0.1) یکسان بود. ضمن اینکه کمترین میزان MIC و MBC در تیمار NN-CH (0.5) گزارش شد.

جدول ٤- حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده تیمارهای تحقیق برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 4- MIC and MBC of research treatments for *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* (µg/ml)

Strain	Treatments	MIC	MBC
Bacillus cereus	N	400	500
	NN	200	400
	NN-CH (0.05)	200	400
	NN-CH (0.1)	200	400
	NN-CH (0.5)	100	200
Staphylococcus aureus	N	200	400
	NN	200	400
	NN-CH (0.05)	100	200
	NN-CH (0.1)	100	200
	NN-CH (0.5)	50	100

نتیجه‌گیری

نانوریزپوشانی نایسین در قالب نانولیپوزوم‌های حامل با پوشش کیتوزان راه حل مناسبی جهت ارتقای خواص فیزیکی و ضدباکتریایی آن است؛ به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش، هر دو خاصیت مذکور به صورت قابل ملاحظه‌ای بهبود می‌یابند. نانولیپوزوم های حامل نایسین با (و بدون) پوشش کیتوزان دارای قابلیت مهار رشد و همچنین حذف باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند که این قابلیت با افزایش غلظت بیشتر می‌شود. مقادیر قطر هاله عدم رشد، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی موید آن است که *باسیلوس سرئوس* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر نایسین و نانولیپوزوم‌های حامل آن مقاوم‌تر است.

منابع

1. Alboghbeish, H., and Khodanazary, A. (2017). Comparative effects of chitosan and nanochitosan coatings enriched with green tea (*Camellia sinensis* L.) extract on quality of Costal trevally fish (*Carangoides coeruleopinnatus*) during refrigerated storage. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *26* (5), 95-109. [In Persian].
2. Bang, S. H., Hwang, I. C., Yu, Y. M., Kwon, H. R., Kim, D. H., and Park, H. J. (2011). Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of Microencapsulation*, *28*(7), 595-604.

3. Begde, D., Bundale, S., Mashitha, P., Rudra, J., Nashikkar, N., and Upadhyay, A. (2011). Immunomodulatory efficacy of nisin, a bacterial lantibiotic peptide. *Journal of Peptide Science*, *17*(6), 438-444. https://doi.org/10.1002/psc.1341
4. Benech, R. O., Kheadr, E. E., Laridi, R., Lacroix, C., and Fliss, I. (2002). Inhibition of Listeria innocua in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(8), 3683-3690.
5. Cheikhyoussef, A., Pogori, N., Chen, W., and Zhang, H. (2008). Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(3), 215-222. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.012
6. Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., and Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, *19*(10), 982-989. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.10.005
7. Da Rosa Zavareze, E., Telles, A. C., El Halal, S. L. M., da Rocha, M., Colussi, R., de Assis, L. M., ... and Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT-Food Science and Technology*, *59*(2), 841-848.
8. Da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., and Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(6), 284- 292. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.03.003
9. Drusch, S., Serfert, Y., Berger, A., Shaikh, M. Q., Rätzke, K., Zaporojtchenko, V., and Schwarz, K. (2012). New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein. *Food Hydrocolloids*, *27*(2), 332-338. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.001
10. Fang, Z., and Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols–a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(10), 510-523. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003
11. Ghorbanzadeh, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., and Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, *216*, 146-152. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.022
12. Hamidi, M., Mousavi Nasab, D., Ahmadi, N., Basati, Gh., Aolad, G., Salimian, J., and Zargar, M. (2012). Synthesis of antimicrobial peptides in bacteria. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, *20* (4), 158-170. [In Persian].
13. Hasani, Sh., Shahidi, M., and Ojagh. M., (2018). The production and evaluation of nanoliposomes containing bioactive peptides derived from fish wastes using the alkalase enzyme. *Research and Innovation in Food Science and Industry*, *8* (1), 31-44. [In Persian].
14. Henriksen, I., Smistad, G., and Karlsen, J. (1994). Interactions between liposomes and chitosan. *International journal of pharmaceutics*, *101*(3), 227-236. https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90218-6
15. Hsieh, Y. F., Chen, T. L., Wang, Y. T., Chang, J. H., and Chang, H. M. (2002). Properties of liposomes prepared with various lipids. *Journal of Food Science*, *67*(8), 2808-2813.
16. Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuillemard, J. C., Lacroix, C., and Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, *13*(4), 325-336. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00194-2
17. Li, Z., Paulson, A. T., and Gill, T. A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*, *19*, 733-743. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.058
18. Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J., and Singh, H. (2015). Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chemistry*, *175*, 16-24. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.108
19. Mosquera, M., Giménez, B., da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., and Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, *156*, 144-150. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.011
20. Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., and Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(13), 2038-2045. https://doi.org/10.1002/jsfa.2576
21. No, H. K., Lee, S. H., Park, N. Y., and Meyers, S. P. (2003). Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, *51*(26), 7659-7663.
22. Nowzari, F., Shábanpour, B., and Ojagh, S. M. (2013). Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, *141*(3), 1667-1672. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.022

23. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., and Hosseini, S. M. H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, *120*(1), 193-198. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.006
24. Paomephan, P., Assavanig, A., Chaturongakul, S., Cady, N. C., Bergkvist, M., and Niamsiri, N. (2018). Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* and their application as vegetable wash disinfectant. *Food Control*, *86*, 294-301. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.021
25. Ramezanzade, L., Hosseini, S. F., and Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, *234*, 220-229. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.177
26. Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R., and Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry*, *135*(4), 2761-2770. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.016
27. Reyhani Poul, S., and Jafarpour, A. (2020). Effect of edible active film of chitosan containing fish protein hydrolysate (FPH) on chemical and microbial properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during the refrigerated storage. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *16* (4), 493-505. [In Persian].
28. Romero-Pérez, A., García-García, E., Zavaleta-Mancera, A., Ramírez-Bribiesca, J. E., Revilla-Vázquez, A., Hernández-Calva, L. M., ... and Cruz-Monterrosa, R. G. (2010). Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles in vitro to improve selenium absorption in ruminants. *Veterinary Research Communications*, *34*(1), 71-79. https://doi.org/10.1007/s11259-009-9335-z
29. Sadeghian, Y., Sadeghi, A.R., Ghorbani, M., Alami, M., and Joshaghani, H. (2019). Investigation of the physical, chemical and antioxidant properties of nanoliposomes loaded with quinoa seed hydrolyzed proteins. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, *15* (2), 71-82. [In Persian].
30. Safari, R., Raftani Amiri, Z., and Esmaeilzadeh Kenari, R. (2018). Optimizing the extraction of phycocyanin pigment from *Spirulina platensis* algae and investigating the qualitative properties of the encapsulated pigment. PhD thesis, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. [In Persian].
31. Sarada, R. M. G. P., Pillai, M. G., and Ravishankar, G. A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, *34*(8), 795-801. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00153-8
32. Sitohy, M., Osman, A., Ghany, A. G. A., and Salama, A. (2015). Antibacterial phycocyanin from Anabaena oryzae SOS13. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, *8*(4), 27-36.
33. Tan, C., Xia, S., Xue, J., Xie, J., Feng, B., and Zhang, X. (2013). Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(34), 8175-8184.
34. Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B., and Beermann, C. (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*, *205*, 221-228. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002
35. Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, K., and Tokuda, K. (1986). Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clinical Chemistry*, *32*(8), 1551-1554.
36. Xia, S., Xu, S., and Zhang, X. (2006). Optimization in the preparation of coenzyme Q10 nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(17), 6358-6366.
37. Yeganeh, S., and Reyhani Poul. (2021). Nanoencapsulation of bioactive peptides from shrimp wastes enzymatic hydrolysis with combined coating of nanoliposome -chitosan and evaluation of antibacterial, antioxidant and antihypertensive activity of the product. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *30* (6), 83-95. [In Persian].
38. Zaerzadeh, E., Mortazavi, A., Jafari, M., Afsharnejad, S., Tabatabaii, F., and Nassiri, M. (2011). Antibacterial effect of nanoencapsulated nisin in liposoms in contrast to free nisin in control of *Listeria monocytogenes* in iranian feta cheese (UF). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *7* (3), 191-199. [In Persian].

Contents

Shelf life extension of chicken fillets by biodegradable chitosan coating containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil during refrigeration 383
Bahmani, Z., Abolfathi, P..
Selection and optimization of ammonium phosphate, potassium sulfate and *Saccharomyces cerevisiae* in the production of acetic acid in a batch fermenter using Response Surface Methodology 397
Teimorimanesh, M., Abbasi, H.
Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of *Trigonella foenum* aqueous extract "*in vitro*" 415
Yousefipour, H., Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Hojjati, M.
Identification and evaluation of the prebiotic effect of water-soluble polysaccharides extracted from green almond hull 427
Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S.
Quantitative evaluation of amino acids and fatty acids profiles of biosilage produced from chicken waste 441
Safari, R., Hosseini, V., Firouzkandian, Sh., Reyhani Poul, S., Kazemi, M.
Investigation of physical and mechanical properties of biodegradable opopanax gum film containing resin and nanoparticles of opopanax 453
Akafian, N., Shekarchizadeh, H.
Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of Rosmarinus officinalis essential oil 467
Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M.
Effect of oligofructose and microencapsulation on viability of Lactobacillus rhamnosus and physicochemical and sensory properties of functional jelly 483
Karegar, F., Pourahmad, R., Rajaei, P.
Using pistachio peel powder and melon seed flour to enrich the Functional-low-fat mayonnaise sauce and evaluation its rheological properties 498
Ghorch Beigi, F., Rahman, A., Hosseinmardi, F**.**
Production of nanoemulsion based on sweet almond and sesame oils using ultrasound and evaluation its properties 514
Heydari Gharehcheshmeh, M., Arianfar, A., Mahdian, E., Naji-Tabasi, S**.**
Preparation and evaluation some properties of pH indicator film based on Arabic gum- Carboxy methyl cellulose composite film containing of Violet basil (*Ocimum basilicum*. L) Anthocyanin 527
Rezaei, A., Rezaei, M., Alboofetileh, M.
Development of an analytical approach for determination of acrylamide content in roasted date seed varieties 543
Khalou Kermani, P., Moeenfard, M., Farhoosh, R., Alves, A.
Application of nanoliposomes containing nisin with chitosan coating and evaluation its physical and antibacterial properties against *Bacillus cereus* and Staphylococcus aureus 561
Reyhani Poul, S., Yeganeh, S., Safari, R.

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 18 No. 4 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.4

2022

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Iranian food science and technology Association

ISSN:1735-4161

Contents

Shelf life extension of chicken fillets by biodegradable chitosan coating containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil during refrigeration 383
Bahmani, Z., Abolfathi, P..

Selection and optimization of ammonium phosphate, potassium sulfate and *Saccharomyces cerevisiae* in the production of acetic acid in a batch fermenter using Response Surface Methodology 397
Teimorimanesh, M., Abbasi, H.

Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of *Trigonella foenum* aqueous extract "*in vitro*" 415
Yousefipour, H., Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Hojjati, M.

Identification and evaluation of the prebiotic effect of water-soluble polysaccharides extracted from green almond hull 427
Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S.

Quantitative evaluation of amino acids and fatty acids profiles of biosilage produced from chicken waste 441
Safari, R., Hosseini, V., Firouzkandian, Sh., Reyhani Poul, S., Kazemi, M.

Investigation of physical and mechanical properties of biodegradable opopanax gum film containing resin and nanoparticles of opopanax 453
Akafian, N., Shekarchizadeh, H.

Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of Rosmarinus officinalis essential oil 467
Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M.

Effect of oligofructose and microencapsulation on viability of Lactobacillus rhamnosus and physicochemical and sensory properties of functional jelly 483
Karegar, F., Pourahmad, R., Rajaei, P.

Using pistachio peel powder and melon seed flour to enrich the Functional-low-fat mayonnaise sauce and evaluation its rheological properties 498
Ghorch Beigi, F., Rahman, A., Hosseinmardi, F.

Production of nanoemulsion based on sweet almond and sesame oils using ultrasound and evaluation its properties 514
Heydari Gharehcheshmeh, M., Arianfar, A., Mahdian, E., Naji-Tabasi, S.

Continue Content in cover

نشریه علمی پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران جلد ۱۸ شماره ۴ سال ۱۴۰۱ 2022 Vol.18 No.4 Iranian Food Science and Technology Research Journal