

عنوان مقالات

- ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر جدا شده از خمیر ترش باکویت ۵۷۷
سارا شهریار - علیرضا صادقی - مریم ابراهیمی - علیرضا صادقی ماهونک - علی مویدی
شناسایی گونه‌های سالمونلا در فرآورده‌های خام مرغ با استفاده از کاوشگر اختصاصی به کمک
روش Real Time PCR ۵۹۱
کبری تاجیک طوغان - محمدرضا عدالتیان دوم - سید علی مرتضوی - علی جوادمنش
تعیین ویژگی‌های شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی عصاره برگ زیتون بر باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی ۶۰۵
بهروز علیزاده بهبهانی - محمد نوشاد - مصطفی رحمتی جنیدآباد
بهینه‌سازی فرمولاسیون نان باگت با گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma leucidum*) ۵۱۷
سعید عزیزخانی - لیلا ناطقی
ارزیابی ویژگی‌های تکنولوژیکی و عملکردی غله صبحانه بر پایه کنجاله کتان و آرد برنج ۶۳۳
علیرضا عباسی - آرش کوچکی - الناز میلانی - محبت محبی
تاثیر استفاده از خشک‌کن خوابیده همزن‌دار با سیستم کنترل رطوبت بر فرایند خشک کردن شلتوک و
فاکتورهای تبدیل ۶۵۰
عاصفه لطیفی - محمدعلی کیه بادرودی نژاد - محمدرضا علیزاده
انکپسولاسیون عصاره آبی ریشه گیاه بابا آدم (*Arctium lappa*) و اثر آن بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و
عملگرایی نوشیدنی سین‌بیوتیک بر پایه آب پرتقال - هویج ۶۵۹
فرزانه اسمعیلی - مهناز هاشمی روان - محمد رضا اسحاقی - حسن گندمی
تاثیر گلیسرول و نانوسلولز بر ویژگی‌های آبدوستی و مکانیکی کامپوزیت‌های ژلاتین - کربوکی متیل سلولز ۶۸۳
ساناز گل محمدزاده خیابان - فرید عمیدی فضلی
ارزیابی فنول و فلاونوئید کل، قدرت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی اسانس انجدان رومی بر برخی از
قارچ‌های عامل پوسیدگی و فساد میوه سیب و پرتقال ۷۰۱
مصطفی رحمتی جنیدآباد - بهروز علیزاده بهبهانی - محمد نوشاد
اثر غنی‌سازی آرد گندم با آرد کنجد بر ویژگی‌های آرد، خمیر و نان‌های سنگک و بربری ۷۱۳
آرمان نادری - سهیلا زرین قلمی
استخراج آنزیمی پلی‌ساکارید سولفات‌ها از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و
بررسی شیمیایی، خواص ضد اکسیدانی و کارکردی آن ۷۲۷
شهاب نقدی - مسعود رضائی - مهدی عبدالحی - مهدی طبرسا
ادامه فهرست داخل جلد

نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران

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

آذر - دی ۱۴۰۱

شماره ۵

جلد ۱۸

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

صاحب امتیاز:

دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول:

دکتر ناصر شاهنوشی

سردبیر:

دکتر فریده طباطبایی

اعضای هیئت تحریریه:

دکتر سید علی مرتضوی

استاد، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، 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 و صنایع غذایی - دفتر نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران. تلفن: ۲۰-۸۷۹۵۶۱۸ داخلی ۲۲۱. نمابر: ۸۷۸۷۴۳۰

این نشریه در پایگاههای زیر نمایه شده است:

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

ifstrj@um.ac.ir

پست الکترونیکی:

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

- ۵۷۷ ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر جدا شده از خمیر ترش باکویت
سارا شهریاری - علیرضا صادقی - مریم ابراهیمی - علیرضا صادقی ماهونک - علی مویدی
- ۵۹۱ شناسایی گونه‌های سالمونلا در فرآورده‌های خام مرغ با استفاده از کاوشگر اختصاصی به کمک روش Real Time PCR
کبری تاجیک طوغان - محمدرضا عدالتیان دوم - سید علی مرتضوی - علی جوادمنش
- ۶۰۵ تعیین ویژگی‌های شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی عصاره برگ زیتون بر باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی
بهروز علیزاده بهبهانی - محمد نوشاد - مصطفی رحمتی جنیدآباد
- ۵۱۷ بهینه‌سازی فرمولاسیون نان باگت با گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma leucidum*)
سعید عزیزخانی - لیلا ناطقی
- ۶۳۳ ارزیابی ویژگی‌های تکنولوژیکی و عملکردی غله صبحانه بر پایه کنجاله کتان و آرد برنج
علیرضا عباسی - آرش کوچکی - الناز میلانی - محبت محبی
- ۶۵۰ تاثیر استفاده از خشک‌کن خوابیده همزن‌دار با سیستم کنترل رطوبت بر فرایند خشک کردن شلتوک و فاکتورهای تبدیل
عاصفه لطیفی - محمدعلی کیه بادرودی‌نژاد - محمدرضا علیزاده
- ۶۵۹ انکپسولاسیون عصاره آبی ریشه گیاه بابا آدم (*Arctium lappa*) و اثر آن بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و عملگرایی نوشیدنی
سین بیوتیک بر پایه آب پر تقال - هوپج
فرزانه اسمعیلی - مهناز هاشمی روان - محمد رضا اسحاقی - حسن گندمی
- ۶۸۳ تاثیر گلیسرول و نانوسلولز بر ویژگی‌های آبدوستی و مکانیکی کامپوزیت‌های ژلاتین - کربوکی متیل سلولز
ساناز گل محمدزاده خیابان - فرید عمیدی فضلی
- ۷۰۱ ارزیابی فنول و فلاونوئید کل، قدرت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی اسانس انجدان رومی بر برخی از قارچ‌های عامل پوسیدگی و فساد میوه سیب و پرتقال
مصطفی رحمتی جنیدآباد - بهروز علیزاده بهبهانی - محمد نوشاد
- ۷۱۳ اثر غنی‌سازی آرد گندم با آرد کنجد بر ویژگی‌های آرد، خمیر و نان‌های سنگک و بربری
آرمان نادری - سهیلا زرین قلمی
- ۷۲۷ استخراج آنزیمی پلی‌ساکارید سولفات‌ها از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و بررسی شیمیایی، خواص ضد اکسیدانی و کارکردی آن
شهاب نقدی - مسعود رضائی - مهدی عبدالحی - مهدی طبرسا
- ۷۴۱ استخراج کلاژن‌های محلول در اسید و محلول در پپسین از فلس کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و تعیین ویژگی‌های آنها
مرجان زرگر - بهاره شعبان‌پور - پرستو پورعاشوری - ابراهیم ذبیحی نیشابوری
- ۷۵۳ اثرات عصاره دانه چیا بر ویژگی‌های شیمیایی و حسی کره حاصل از خامه شیرین طی نگهداری در یخچال
زهرا صدیقی صائین - محمدرضا خانی - وجیه فدائی نوغانی
- ۷۶۷ تاثیر سیکلودکسترین‌ها و کوپیکمانتاسیون بر پایداری حرارتی عصاره آنتوسیانینی گلبرگ زعفران در نوشیدنی مدل
حامد صابریان - وحید پاسبان نوقابی



Evaluation of probiotic and antifungal properties of the yeast isolated from buckwheat sourdough

Sara Shahryari¹, Alireza Sadeghi^{1*} , Maryam Ebrahimi², Alireza Sadeghi Mahoonak¹ , Ali Moayed¹

Received: 2021.12.04

Revised: 2022.01.03

Accepted: 2022.01.16

Available Online: 2022.01.16

How to cite this article:

Shahryari, S., Sadeghi, A. Ebrahimi, M. Sadeghi Mahoonak, A. Moayed, A. (2022). Evaluation of probiotic and antifungal properties of the yeast isolated from buckwheat sourdough. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 575-588.

Abstract

Introduction: Evaluation of antimicrobial and probiotic properties of the microbiota isolated from fermented pseudo-cereals is important in order to prepare adjunct and starter cultures. Probiotics are live and active microorganisms that, if used in sufficient numbers, help the microbial balance of the gastrointestinal tract and improve its function. Probiotics are also used as a substitute for antibiotics and synthetic preservatives in the prevention and treatment of complications of many infectious and pathogenic gastrointestinal pathogens. Probiotic microorganisms include lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, and despite numerous reports on the probiotic properties of LAB, the probiotic properties of yeasts are less reported. Probiotic yeasts are organisms resistant to antibacterial compounds and effective against pathogens, which can rapidly increase their population in the gastrointestinal tract. These yeasts have several properties such as antimicrobial effects, resistance to acid and bile, binding to mucosal surfaces, inhibitory activity against pathogens and also the inability to transmit antibiotic resistance genes. In the present study, after isolation of the predominant yeast from buckwheat sourdough, the probiotic and antifungal properties of the isolate were investigated. Based on the literature review, no study has been presented to evaluate the probiotic and antifungal capabilities of yeasts isolated from buckwheat sourdough.

Materials and Methods: In the present study, predominant yeast was isolated from buckwheat sourdough, and then it was identified using PCR. Subsequently, probiotic properties of the isolate including survival in presence of low pH and bile salt, antibacterial effect, antibiotic susceptibility assay, aggregation, hydrophobicity, haemolytic activity as well as its antifungal activity against *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* were studied. After spontaneous fermentation of buckwheat, predominant yeast was isolated using ten-fold dilution of the sourdough sample and its spread plating. The predominant isolate was identified through PCR amplification of a 650 bp target sequence from its ribosomal gene and sequencing of the PCR product. Then, survival of the yeast was determined at pH=2 and 0.3% bile salt as simulated gastrointestinal conditions. Subsequently, simultaneous culture of the yeast with some food-borne indicator bacteria in chromogenic media was used to investigate the inhibitory activity of the isolate against the studied bacteria. After that, resistance of the yeast isolate against the common antibiotics and some antimycotic agents was evaluated using disc method. Co-aggregation ability and hydrophobicity capability of the isolate were also determined based on the absorbance tests. In vitro safety of the yeast isolate was checked through its cultivation on blood agar containing sheep blood. Next stage, overlay bioassay was conducted to investigate antifungal effect of the yeast on the selected fungi. Finally, one way analysis of variance (ANOVA) with the least significant differences (LSD) post hoc at $p < 0.05$ was used for statistical analysis of the data.

Results and Discussions: Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Pichia kudriavzevii* as predominant yeast isolated from buckwheat sourdough. Survival rate of the isolate after treatment in simulated

1. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2. Health Research Center of Food, Drug and Natural Products, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran.

(*Corresponding Author Email: Sadeghi.gau@gmail.com)

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.74006.1119](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74006.1119)

gastrointestinal conditions was 79.26% in comparison with the control. Antibacterial effect of the isolate on *Escherichia coli* was also significantly ($P<0.05$) higher than the other studied food-borne agents. Meanwhile, the growth of *Listeria monocytogenes* was decreased 19.50% in the present of the isolate. Whereas, the yeast isolate had no inhibitory effect on *Salmonella enterica*. Hydrophobicity and auto-aggregation capabilities of the isolate were also 64.07 and 67.40%, respectively. Furthermore, the isolate showed resistance towards all of the antibiotics tested, while it was resistant against ketoconazole and fluconazole, and the yeast was semi-sensitive towards itraconazole as antimycotic agents. The yeast isolate had no hemolytic activity, and its antifungal activity against *A. niger* and *A. flavus* was also verified. Accordingly, it is concluded that *P. kudriavzevii* isolate exhibits proper potential to be used as probiotic or protective culture in fermentation industries.

In accordance with the results, probiotic characteristics of *P. kudriavzevii* (as the predominant yeast isolated from buckwheat sourdough) were approved. Accordingly, the isolate can be used as a potential probiotic culture in food industries.

Keywords: Yeast isolate, Buck wheat sourdough, Probiotic properties, Antifungal effect.

مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر جدا شده از خمیرترش باکویت

سارا شهریاری^۱ - علیرضا صادقی^{۱*} - مریم ابراهیمی^۲ - علیرضا صادقی ماهونک^۱ - علی مویدی^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶

چکیده

ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی و پروبیوتیکی فلور میکروبی جدا شده از شبه غلات تخمیر شده جهت تامین کشت‌های میکروبی همراه و آغازگر از اهمیت به سزایی برخوردار است. در این پژوهش، مخمر غالب از خمیرترش باکویت، جداسازی و با استفاده از PCR شناسایی گردید. سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی و همچنین اثر ضدقارچی این جدایه مخمری بر روی *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* مورد مطالعه قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی مخمر *Pichia kudriavzevii* به عنوان جدایه مخمری خمیرترش باکویت شد. نرخ زنده‌مانی جدایه مذکور پس از تیمار متوالی اسید و صفرا در مقایسه با نمونه شاهد ۷۹/۲۶ درصد بود. همچنین اثر ضدباکتریایی آن در برابر *Escherichia coli* نسبت به سایر عوامل غذازاد مورد مطالعه به شکل معنی داری ($p < 0.05$) بیشتر بود. با این حال، رشد *Listeria monocytogenes* در حضور جدایه مخمری ۱۹/۵۰ درصد کاهش یافت اما این جدایه، اثر بازدارنده‌ای بر *Salmonella enterica* نداشت. قابلیت‌های آگریزی و خوداتصال جدایه مذکور نیز به ترتیب، ۶۴/۰۷ و ۶۷/۴۰ درصد تعیین گردید. علاوه بر این، جدایه مخمری نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، مقاومت نشان داد اما در برابر آنتی‌میکروبیکی‌های کتوکونازول و فلوکونازول، مقاوم و همچنین نسبت به ایتراکونازول دارای حساسیت نسبی بود. این جدایه مخمری، فاقد فعالیت همولیتیک بود و اثر ضدقارچی آن در برابر *A. niger* و *A. flavus* نیز مورد تایید قرار گرفت. بر این اساس، جدایه *P. kudriavzevii* از قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک و یا محافظت کننده در صنایع تخمیری برخوردار می باشد.

واژه‌های کلیدی: جدایه مخمری، خمیرترش باکویت، ویژگی‌های پروبیوتیکی، اثر ضدقارچی.

مقدمه

غذاهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته و سبب بهبود ویژگی‌های حسی محصولات تخمیری نظیر طعم و بوی آنها گردند. این اثرات ناشی از فعالیت‌های متابولیکی آنزیم‌هایی مانند استرازاها و لیپازها هستند که از مخمرها منشا می‌گیرند (Bevilacqua et al., 2012). پروبیوتیک به میکروارگانیسم زنده و فعالی اطلاق می‌شود که در صورت استفاده به تعداد کافی به توازن میکروبی دستگاه گوارش، کمک کرده و سبب بهبود عملکرد آن می‌شود. پروبیوتیک‌ها همچنین به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های سنتزی در پیشگیری و درمان عوارض بسیاری از عوامل عفونی و بیماری‌زای دستگاه گوارش مورد استفاده قرار می‌گیرند (Saad et al., 2013, Saarela et al., 2000). میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، شامل باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها هستند و علیرغم وجود گزارش‌های متعدد در خصوص قابلیت‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک، ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرها کمتر گزارش شده است. مخمرهای پروبیوتیک، ارگانیسم‌های مقاوم به ترکیبات ضدباکتریایی و موثر در برابر عوامل

مخمرها گروه بزرگ و غیریکنواختی از میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی متعلق به رده آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها هستند که به نحو گسترده‌ای در فراورده‌های غذایی تخمیری و زیستگاه‌های طبیعی وجود دارند (Rima et García-Hernández et al., 2012). مخمرها تاریخچه طولانی از ایمنی و کاربردهای فناورانه در صنایع غذایی داشته و در تولید فراورده‌های تجاری نظیر غذاها و نوشیدنی‌ها، ترکیبات غذا- دارویی و همچنین آنزیم‌های صنعتی حائز اهمیت هستند (Moslehi Jenabian et al., 2010). این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به عنوان کشت‌های آغازگر برای تخمیر

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات سلامت فراورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: Email: Sadeghi.gau@gmail.com
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74006.1119

ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی مخمر *P. kudriavzevii* توسط تکنیک PCR به کمک پرایمرهای *rRNA* ۱۸S گزارش کردند که مخمر مذکور در برابر غلظت‌های فیزیولوژیک نمک‌های صفراوی، پپسین و آنزیم پانکراتین از خود مقاومت نشان داد و از قابلیت‌های خوداتصال و دگراتصال مناسبی نیز برخوردار بود. همچنین مخمر مورد آزمون حدود ۷۵ درصد آبگریزی در تولون و ۵۹ درصد آبگریزی در زایلن داشت و از رشد ۱۳ عامل بیماری‌زا ممانعت نمود و در برابر ۳۰ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی نیز مقاومت نشان داد. این مخمر و متابولیت‌های آن دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲ ساعت تحمل کرد و لذا به‌عنوان کشت بالقوه آغازگر یا همراه پروبیوتیک در محصولات تخمیری و فراورده‌های غذایی گرمادیده معرفی شد. سویه‌های مخمری همچنین قادر به بهبود فلور میکروبی روده، اصلاح متابولیسم و عملکرد سیستم ایمنی بدن بوده و دارای اثرات ضدالتهابی و ضد تکثیر سلول‌های سرطانی بودند. سویه‌های مخمری *P. kudriavzevii* متابولیت‌هایی ترشح می‌کنند که فعالیت ضدسرطانی در روده بزرگ انسان داشته و این اثر را از طریق القا آپوپتوز به‌عنوان مکانیسم اصلی از خود بروز می‌دهند (Chelliah et al., 2016).

Sakandar و همکاران (۲۰۱۸) ضمن جداسازی و ارزیابی قابلیت تجزیه گلوتن توسط *Wickerhamomyces anomalus* و همچنین بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمر جدا شده از تخمیر تصادفی خمیرترش نتیجه گرفتند که مخمر مذکور، قادر به تحمل pH پایین و نمک صفراوی و همچنین دارای ویژگی‌های آبگریزی در مقایسه با سایر سویه‌های تجزیه کننده گلوتن بود و لذا از آن به‌عنوان سویه پروبیوتیک برای تخمیر خمیرترش استفاده شد (Sakandar et al., 2018). Palla و همکاران (۲۰۱۹) پس از مطالعه مخمرهای ذاتی خمیرترش توسکان به‌عنوان کشت آغازگر برای تولید نوشیدنی‌های عملگر بر پایه غلات، ۷۸ سویه را به‌صورت تصادفی انتخاب کرده و مورد ارزیابی مولکولی قرار دادند. محققین مذکور، گزارش کردند که مخمرهای *S. cerevisiae* و *Kazachstania humilis* به‌ترتیب در این خمیرترش غالب بودند. همچنین پس از تخمیر آرد گندم تحت شرایط استاندارد، مشخص شد که هر دو سویه مذکور دارای فعالیت فیتازی بودند و مخمر *S. cerevisiae* قادر به افزایش حجم خمیر بود در حالی که مخمر *K. humilis* تنها گونه‌ای بود که توانست غلظت اسیدهای آمینه آزاد را افزایش دهد (Palla et al., 2019). Greppi و همکاران (۲۰۱۵) ضمن مطالعه قابلیت پروبیوتیکی سویه‌های مخمر *Pichia* و ارزیابی توانایی افزایش محتوای فولات در غذاهای تخمیری آفریقایی بر پایه غلات دریافتند که از بین ۹۳ سویه مخمری جدا شده فقط سویه منتخب *P. kudriavzevii* دارای قابلیت‌های

بیماری‌زا هستند که می‌توانند به‌سرعت جمعیت خود را در دستگاه گوارش افزایش دهند (Fernandez-Pacheco et al., 2018). این مخمرها از ویژگی‌های متعددی نظیر خاصیت ضد میکروبی، مقاومت به اسید و صفرا، اتصال به سطوح مخاطی، فعالیت بازدارنده علیه عوامل بیماری‌زا و همچنین عدم قابلیت انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک برخوردارند (Andrabi et al., Bajaj et al., 2021). الیه Czerucka و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که برخی از سویه‌های مخمری قادر به کاهش محتوای مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی و در دستگاه گوارش هم هستند (Czerucka et al., 2007). باکویت متعلق به جنس فاگوپیروم و خانواده پلی‌گوناسه، یکی از شبه‌غلات است که حاوی طیف وسیعی از ترکیبات مغذی و زیست فعال نظیر پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و مواد معدنی می‌باشد (Zhu, 2016). تاکنون گزارش‌هایی در خصوص ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمرهای جدا شده از غلات و شبه غلات تخمیر شده ارائه گردیده است. به‌عنوان مثال، Moroni و همکاران (۲۰۱۱) طی بررسی جمعیت میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها در تخمیر تصادفی باکویت، نشان دادند که مخمر *Kazachstania barnetti* تنها مخمر جدا شده از باکویت تخمیر شده بود. محققین مذکور از این مخمر به‌عنوان کشت آغازگر جهت تولید نان‌های فاقد گلوتن استفاده نمودند (Moroni et al., 2011). Perricone و همکاران (۲۰۱۴) پس از ارزیابی خصوصیات فناوری مخمرهای جدا شده از خمیرترش آلمانورا دریافتند که ۱۸ جدایه دارای فعالیت آنزیمی مناسبی بوده و به‌همین منظور جهت تعیین خصوصیات پروبیوتیکی مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج نشان داد که دو سویه از *Saccharomyces cerevisiae* دارای بیشترین زنده‌مانی در pH=۲/۵ و حضور نمک‌های صفراوی بودند. همچنین جدایه‌های مذکور از مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فعالیت ضد میکروبی مناسبی در مقابل عوامل بیماری‌زای غذازاد برخوردار بودند و به‌عنوان کشت آغازگر در فرآوری محصولات بر پایه غلات انتخاب گردیدند (Perricone et al., 2014).

Greppi و همکاران (۲۰۱۷) خصوصیات پروبیوتیکی مخمر *P. kudriavzevii* را مورد آزمون قرار دادند که بهترین نتایج را در pH=۲ و نمک صفراوی ۰/۳ درصد از خود نشان داد. نرخ زنده‌مانی مخمر مذکور پس از تیمار در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان در محدوده ۱۱ الی ۴۵ درصد بود درحالی‌که میزان خود اتصالی (Auto-aggregation) آن بین ۱۲ الی ۴۰ درصد گزارش گردید. همچنین سویه‌های مخمری مورد آزمون قادر به تولید فولات بودند و اثرات مثبت تغذیه‌ای و پروبیوتیکی بر مصرف‌کننده داشتند (Greppi et al., 2017). Chelliah و همکاران (۲۰۱۴) ضمن شناسایی و

سرانجام مقدار حجم سود مصرفی حاکی از میزان اسیدیته قابل تیترا بر حسب اسید لاکتیک بود (Angelov et al., Moroni et al., 2011)؛ (2005).

جداسازی و شناسایی جدایه مخمری

برای جداسازی مخمر غالب خمیرترش باکویت از رقت‌سازی متوالی و کشت سطحی خمیرترش حاصل از تخمیر تصادفی در محیط کشت اختصاصی Yeast Glucose (YGC) agar Chloroamphenicol استفاده شد. سپس از پرگنه‌های مذکور، کشت خطی تهیه گردید و پرگنه‌های خالص به‌دست آمده بر اساس خصوصیات فنوتیپی بررسی شدند. در ادامه DNA جدایه مخمری، با استفاده از کیت تجاری (Geneall، کره جنوبی) استخراج شد و توسط PCR دارای پرایمرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')، تکثیر و متعاقباً محصولات PCR (توالی ۶۵۰ جفت بازی)، توسط شرکت پیشگام (ایران) توالی‌یابی گردید. پس از بهینه‌یابی مقادیر واکنشگرهای تکثیر و چرخه‌های حرارتی، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنشگرهای آماده مصرف PCR (Ampliqon، دانمارک)، ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۵ پیکومولار، ۲ میکرولیتر DNA با غلظت تقریبی ۱۰۰ نانوگرم و ۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه در دستگاه ترموسایکلر (Biorad، آمریکا) صورت گرفت. در مرحله اول تکثیر توالی هدف، واسرشت DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، آغاز گشته و طی ۳۰ چرخه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. سرانجام، مرحله تکثیر انتهایی نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه پیدا کرد. پس از ژل الکتروفورز محصولات PCR در آگارز ۱/۵ درصد در بافر Tris boric (TBE) EDTA acid، به‌منظور شناسایی جدایه مخمری، محصولات PCR پس از توالی‌یابی با استفاده از رویه Blast با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI هم‌ردیف گردیدند (White et al., 1990).

زنده‌مانی جدایه مخمری پس از تیمار متوالی اسید و صفرا

ابتدا جمعیت جدایه مخمری به 10^8 واحد تشکیل دهنده پرگنه بر میلی‌لیتر (CFU/mL) تنظیم گردید (برای تنظیم جمعیت مخمر از روش کدورت‌سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر در مقایسه با منحنی استاندارد با تعیین ضریب تصحیح حاصل از کشت سطحی استفاده گردید). سپس pH محیط کشت حاوی این جدایه با استفاده از اسید

پروبیوتیک مناسب بود و لذا از آن در تخمیر ارزن مرواریدی به همراه *Lactobacillus fermentum* با هدف بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای استفاده شد (Greppi et al., 2015). علاوه بر این، Pedersen و همکاران (۲۰۱۲) پس از بررسی جمعیت میکروبی و قابلیت‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از فوراً (محصول تخمیر تصادفی ارزن مرواریدی)، مشخص گردید که مخمرهای *Candida krusei*، *Candida*، *Candida tropicalis*، *Kluyveromyces marxianus* و *fabianii* *Trichosporon asahii* غالب بودند. همچنین سویه‌های مذکور به دلیل دارا بودن قابلیت‌های ذاتی پروبیوتیکی، به‌عنوان کشت‌های آغازگر مورد استفاده قرار گرفتند (Pedersen et al., 2012).

در پژوهش حاضر، پس از جداسازی مخمر غالب خمیرترش باکویت، خصوصیات پروبیوتیکی و ضدقارچی جدایه مذکور مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس بررسی منابع صورت گرفته، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص ارزیابی قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمرهای جدا شده از خمیرترش باکویت ارائه نشده است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم‌های غذازاد مورد استفاده در این مطالعه شامل *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *E. coli* PTCC 1399، *S. enterica* PTCC 1709، *L. monocytogenes* PTCC 1298، *A. niger* PTCC 5012 و *A. flavus* PTCC 5018 از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. محیط‌های کشت میکروبی و مواد شیمیایی مصرفی نیز از شرکت Merck (آلمان)، خریداری گردیدند. برای تهیه آرد کامل باکویت (کیان فود-ایران) از دستگاه آسیاب (آسان توس شرق، ایران) و سپس الک با مش ۵۰ استفاده شد. پس از تهیه آرد باکویت، ویژگی‌های آن شامل محتوای چربی، پروتئین، رطوبت، خاکستر و کربوهیدرات کل بر اساس روش‌های استاندارد تعیین گردید (AACC, 2010).

تخمیر تصادفی باکویت

تخمیر تصادفی باکویت (بدون افزودن کشت آغازگر) از مخلوط ۱۰۰ گرم آرد باکویت و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با بازده خمیر (نسبت خمیر به آرد $100 \times$) معادل ۲۰۰ در ظروف استریل تهیه شد. سپس مخلوط مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس مقادیر pH و اسیدیته قابل تیترا آن تعیین شد. بدین منظور ۱۰ گرم نمونه با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و به کمک سود ۰/۱ نرمال تا pH معادل ۸/۵ تیترا گردید و

تعیین میزان آبگریزی جدایه مخمری

به منظور ارزیابی قابلیت آبگریزی جدایه مخمری، ابتدا سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته جدایه مذکور توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و برای ۵ دقیقه) جدا گردید. پس از تنظیم جمعیت جدایه مخمری به 10^5 CFU/mL، سه میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری با یک میلی‌لیتر زایلن مخلوط شده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس جذب روماند مخلوط مذکور در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانش شده و بر اساس رابطه ذیل، میزان آبگریزی جدایه محاسبه گردید. در این رابطه، OD_0 مقدار جذب در زمان صفر و OD مقدار جذب پس از سه ساعت است (Zullo and Cifardini, 2019)

$$[(OD_0 - OD) / OD_0] \times 100 \quad (2)$$

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و آنتی‌مایکوتیکی

مقاومت جدایه مخمری در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج شامل استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، ونکومایسین، سفازولین، سفتریاکسون، سفالوتین، آمپی‌سیلین، ایمی‌پنم و پنی‌سیلین با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین مقاومت این مخمر نسبت به برخی از ترکیبات آنتی‌مایکوتیک شامل ایتراکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول، ناتامایسین، سوربات پتاسیم و پروپیونات کلسیم نیز بررسی شد. بدین منظور ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه مخمری به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت YGC یک درصد آگار (دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد) افزوده شد و سپس بر روی پلیت‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط YGC agar ۱/۵ درصد منتقل گردید. در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی سطح این پلیت‌ها قرار گرفتند و پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. نهایتاً قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و نتیجه آزمایش به صورت مقاوم (قطر کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر)، حساسیت نسبی (قطر ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر) و حساس (قطر بیشتر از ۲۰ میلی‌متر) گزارش گردید (Rojo-Bezares, Fekri et al., 2020, et al., 2006).

قابلیت همولیز خون

برای این منظور، جدایه مخمری بر روی سطح محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون گوسفندی، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ایجاد هاله

کلریدریک ۱ نرمال به حدود ۲ رسانده شد. در ادامه، سوسپانسیون مخمری به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس سوسپانسیون مذکور به مدت ۱/۵ ساعت در مجاورت نمک صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد و pH معادل ۸ قرار داده شد. در مرحله بعد، رقت‌های متوالی از محلول مذکور در رینگر استریل، تهیه و به صورت سطحی بر روی محیط کشت YGC agar کشت داده شد. نهایتاً تعداد مخمر زنده پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با نمونه شاهد (بدون تیمار اسید و صفرا) مشخص گردید (Rolim et al., 2015).

اثرات ضدباکتریایی جدایه مخمری با استفاده از محیط‌های

کشت کروموژنیک

برای بررسی اثر ضد باکتریایی جدایه مخمری در برابر *S. aureus*، *S. enterica*، *E. coli*، *L. monocytogenes* از کشت توام آن‌ها بر روی محیط‌های کشت کروموژنیک استفاده شد. بدین منظور، پس از تهیه کشت تازه ۲۴ ساعته از میکروارگانیسم‌های مذکور و تنظیم جمعیت آن‌ها، مخمر منتخب با نسبت و جمعیت یکسان با هر یک از باکتری‌های غذازاد، مخلوط گردیده و سپس مخلوط مذکور به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه با تهیه رقت‌های متوالی از این سوسپانسیون در محیط کشت کروموژنیک، کشت سطحی داده شد و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. پس از طی زمان مذکور، تعداد کلنی‌ها شمارش و با تعداد کلنی‌های نمونه شاهد که فقط حاوی عامل بیماری‌زا بود، مقایسه گردید (Danielski et al., 2017).

قابلیت خود اتصالی

برای ارزیابی قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری، سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته آن توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (یونیورسال، ایران) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و برای ۵ دقیقه جدا و طی دو مرحله با بافر فسفات استریل، شستشو داده شد. سپس ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمر (حاوی جمعیت 10^5 CFU/mL) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در مرحله بعد، جذب نوری سوسپانسیون در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر (Cecil، انگلستان) تعیین شد و نهایتاً میزان قابلیت خود اتصالی بر اساس رابطه ۱ محاسبه گردید. در این رابطه A_t مقدار جذب پس از ۲۴ ساعت و A_0 مقدار جذب در زمان صفر است (Gil-Rodriguez et al., 2015).

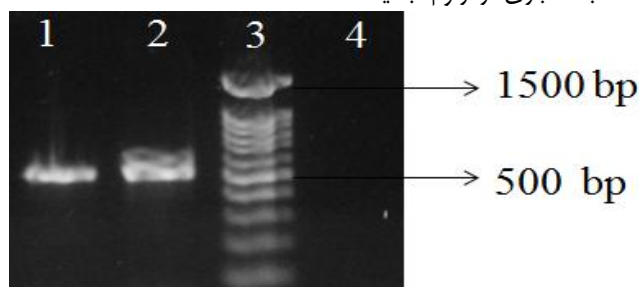
$$[1 - (A_t / A_0)] \times 100 \quad (1)$$

مخمري مذکور توسط ژل الكتروفورز محصولات PCR مورد تايد قرار گرفت (شكل ۱). توالی‌یابی محصولات PCR در مقایسه با داده‌های موجود در بانک جهانی ژن نیز منجر به شناسایی *P. kudriavzevii* SB01 (۹۸ درصد تشابه) به‌عنوان جدایه مخمری غالب خمیرترش باکویت شد.

بعد از تنظیم جمعیت جدایه مخمری (10^8 CFU/mL)، میزان زنده‌مانی آن پس از تیمار متوالی اسید و صفرا، معادل $5/17 \pm 79/26$ درصد بود. نتایج آزمون ضدباکتریایی جدایه مخمری در شكل ۲ نشان داده شده است. اثر بازدارندگی جدایه مخمری بر روی هر چهار شاخص باکتریایی مورد مطالعه به شکل معنی‌داری ($p < 0/05$) متفاوت بود. این اثر به‌ترتیب بر روی *E. coli*، *L. monocytogenes* و *S. aureus* کاهش یافت و بر روی *S. enterica* هیچ‌گونه اثر بازدارندگی مشاهده نشد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده، میزان قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری $2/96 \pm 67/40$ درصد و میزان آبگریزی آن $0/2 \pm 64/07$ درصد بود. همچنین جدایه مخمری در برابر تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، مقاوم بود. نتایج مقاومت آنتی‌مایکوتیکی جدایه مخمری نیز در جدول ۱ آمده است. بر این اساس، جدایه مذکور در برابر آنتی‌مایکوتیک‌های رایج مانند کتوکونازول و فلوکونازول، مقاوم و در برابر ایتراکونازول و ناتامایسین، نیمه حساس و در مقابل سوربات پتاسیم و پروپیونات کلسیم، مقاوم بود.

نتایج پژوهش حاضر همچنین نشان داد که جدایه مخمری مورد مطالعه، فاقد هر گونه فعالیت همولیزی بود. اثر ضدقارچی جدایه مخمری بر روی *A. niger* نیز بعد از پنج روز گرمخانه‌گذاری در مقایسه با نمونه کنترل (شكل ۳)، مشهود بود به نحوی که این جدایه $7/53 \pm 28/93$ درصد از رشد قارچ مذکور جلوگیری کرد. همچنین اثر ضدقارچی جدایه مخمری بر روی *A. flavus* نیز منجر به $10/83 \pm 33/88$ درصد کاهش رشد آن شد.



شكل ۱- ژل الكتروفورز محصولات PCR. لاین ۱: جدایه مخمری، لاین ۲: کنترل مثبت، لاین ۳: لدر، لاین ۴: کنترل منفی.

Fig. 1. Gel electrophoresis of PCR products. Line 1: yeast isolate, line 2: positive control, line 3: DNA ladder, line 4: negative control.

و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی گردید (Suvarna et al., 2018).

اثر ضدقارچی

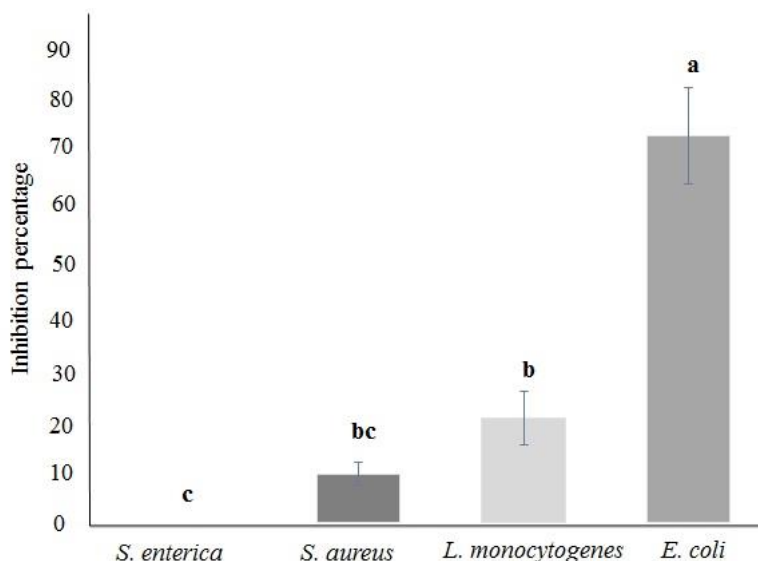
بدین منظور، ابتدا جدایه مخمری در محیط YGC agar با روش اسپات (لکه‌گذاری) کشت داده شد و سپس سوسپانسیون اسپور قارچ‌های غذازاد *A. niger* و *A. flavus* (10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر) به صورت لایه دوم به همراه Potato Dextrose Agar (PDA) بر روی آنها ریخته شده و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. در انتها قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف مخمر کشت داده شده اندازه‌گیری شد (Magnusson et al., 2003).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج حاصل از این پژوهش به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شده و برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) و برای ترسیم نمودارها از Microsoft Office Excel 2016 استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح $p < 0/05$ انجام گرفت و نتایج به صورت "میانگین $\pm$ انحراف معیار" گزارش شدند.

نتایج و بحث

آرد باکویت مورد استفاده در این پژوهش، دارای ۴/۱۳ درصد چربی، ۱۲/۰۲ درصد پروتئین، ۲/۰۹ درصد خاکستر، ۱۲/۶۰ درصد رطوبت و ۶۹/۱۶ درصد کربوهیدرات کل بود. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تخمیر خمیرترش باکویت، اسیدیته قابل تیترا خمیرترش به ۲/۳ رسید. پس از رقت‌سازی و کشت خمیرترش باکویت، یک مخمر بیضوی کشیده با حالت خامه‌ای به‌عنوان مخمر غالب از خمیرترش باکویت جدا شد. تکثیر توالی هدف ۶۵۰ جفت بازی از ژنوم جدایه



شکل ۲- قطر هاله عدم رشد عوامل باکتریایی غذازاد در حضور مخمر *Pichia kudriavzevii* جدا شده از خمیرترش باکویت. حروف ناهمسان، نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p < 0.05$ می باشد.

Fig. 2. The diameter of inhibition zone against foodborne bacteria in the presence of *Pichia kudriavzevii* isolated from buckwheat sourdough. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

جدول ۱- مقاومت مخمر *Pichia kudriavzevii* جدا شده از خمیرترش باکویت در برابر برخی از ترکیبات آنتی مایکوتیک

Table 1- Resistance of *Pichia kudriavzevii* isolated from buckwheat sourdough against some anti-mycotic compounds

قطر هاله عدم رشد (میلی متر) Diameter of inhibition zone (mm)	میزان حساسیت Susceptibility	آنتی مایکوتیک (میکروگرم ماده موثره) antimycotic agents (microgram per disc)
14.188± 2.766 ^{ab}	حساسیت نسبی intermediate	ایتراکونازول (10) Itraconazole
12.847± 0.050 ^b	مقاوم resistant	فلوکونازول (15) Fluconazole
11.098± 0.176 ^c	مقاوم resistant	کتوکونازول (20) Ketoconazole
0	مقاوم resistant	سوربات پتاسیم (60) Potassium Sorbate
0	مقاوم resistant	پروپیونات کلسیم (60) Calcium Propionate
15.068± 2.052 ^a	حساسیت نسبی intermediate	ناتامایسین (30) Natamycin

*حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.05$ می باشد.

*Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

کمتر گزارش شده است. در این پژوهش، *P. kudriavzevii* جدا شده به عنوان جدایه مخمری غالب خمیرترش باکویت دارای قابلیت هایی نظیر اثرات ضد میکروبی، توانایی زنده ماندن پس از تیمار متوالی اسید و صفرا و الگوی مقاومت آنتی مایکوتیکی مشخصی بود. طی مطالعات

استفاده از باکویت تخمیر شده، یعنی باکویتی که با بازده خمیر معین، تحت شرایط تخمیر قرار می گیرد (Zielinski et al., 2019); (Ahmed et al., 2014) به عنوان سوسترای تخمیر به منظور جداسازی کشت های میکروبی مناسب (ضدمیکروب و پروبیوتیک)

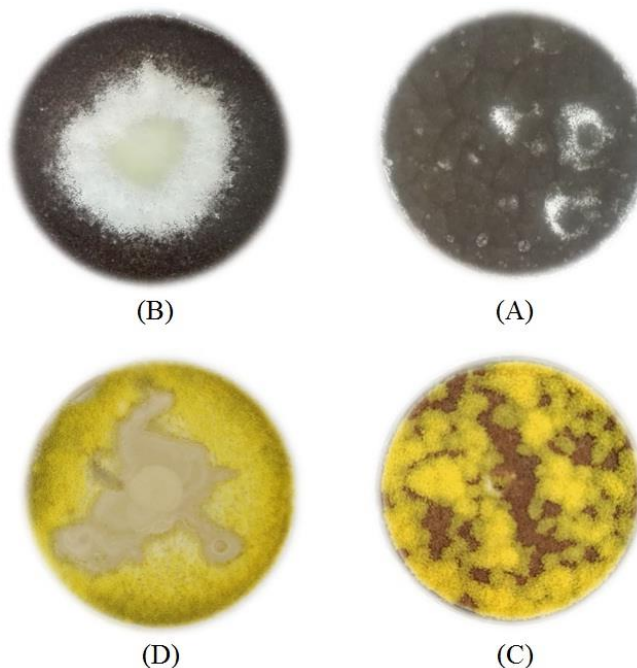
نمک صفراوی در پروبیوتیک‌ها می‌گردند. همچنین کاهش pH سبب ممانعت از متابولیسم و کاهش میزان رشد و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها می‌شود درحالی‌که مقاومت برخی از پروبیوتیک‌ها به کاهش pH به واسطه خنثی‌سازی اسید است (Montville and Matthews, 2012).

در بخش دیگری از نتایج پژوهش حاضر، اثر ضد باکتریایی مخمر *P. kudriavzevii* علیه *S. aureus*، *L. monocytogenes* و همکاران *E. coli* به روش کشت توام به اثبات رسید. Fakruddin و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که یک زیرگونه از مخمر *S. cerevisiae* اثر بازدارندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم منفی مانند *E. coli* نسبت به باکتری‌های گرم مثبت داشت که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد ولی بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی آن بر *Vibrio cholera* و *Bacillus polymyxa* مشاهده شد (Fakruddin et al., 2017). همچنین زیرگونه دیگری از همین مخمر، ممانعت‌کنندگی مناسبی در برابر *S. aureus* و *E. coli* داشت که اثر مذکور به تولید متابولیت‌های فلاونوئیدی (شامل نارینجینین، هموجنتیسینک اسید، پلریتیک اسید و فنیل لاکتالدهید) توسط این مخمر نسبت داده شد (Ng et al., 2019). پژوهشگران دیگری نشان دادند که بسیاری از مخمرهای جنس *Cryptococcus*، *Candida*، *Saccharomyces*، *Debaryomyces*، *Kluyveromyces*، *Pichia* و *Zygosaccharomyces* قادر به تولید مایکوسین هستند. بعدها سایر محققین دریافتند که عمل بازدارنده مخمرها با تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه نظیر توکسین‌های کشنده به‌نام مایکوسین‌ها مرتبط است. مایکوسین‌ها نوعی پروتئین یا گلیکوپروتئین خارج‌سلولی بوده که به‌عنوان سموم کشنده بر عوامل ناخواسته اثر بازدارنده دارند (Rima et al., 2012). پژوهشگران دیگری نیز از روش کشت توام در محیط کشت کروموزنیک به هدف تعیین اثر بازدارندگی *Carnobacterium maltaromaticum* علیه *E. coli*، *L. monocytogenes* و *Salmonella Typhimurium* استفاده کردند (Danielski et al., 2017). پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متعددی مانند ترشح مواد ضد میکروبی، رقابت برای مواد غذایی، تولید اتانول، تولید پپتیدهای آبگریز و تصاحب جایگاه اتصال سلول‌ها در اپی‌تلیال روده، کاهش لانه‌گزینی عوامل بیماری‌زا و ممانعت از ایجاد عفونت می‌توانند از اثر باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (Janković et al., 2012). به‌طور خلاصه، اثر ضد میکروبی مخمرهای حاضر در محصولات غذایی تخمیری و نوشیدنی‌ها، به واسطه فعالیت اسیدهای آلی، اسیدهای فرار، پراکسید هیدروژن و سایر پیش‌ماده‌های ضد میکروبی تولیدی است (Viljoen., Marquina et al., 2002 ; 2006).

اخیر، گونه غالب خمیرترش باکویت پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، *K. barnetti* گزارش گردید (Moroni et al., 2011). در پژوهش دیگری نیز خمیرترش باکویت با بازده خمیر ۲۷۵ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تخمیر گردید اما از آن هیچ گونه مخمیری جدا نشد (Moroni et al., 2011). بنابراین، سوبسترا و شرایط تخمیر بر تفاوت مخمرهای غالب جدا شده موثر هستند. البته تنوع فلور میکروبی بومی دانه غلات و آرد آنها، تحت تاثیر شرایط کشت و نگهداری نیز قرار می‌گیرد (De Vuyst and Neysens, 2005). همچنین نوع غله به‌واسطه مقدار و کیفیت کربوهیدرات‌ها به عنوان سوبسترای اولیه تخمیر، منبع تامین نیتروژن و عوامل رشد، یکی دیگر از مهم‌ترین عوامل موثر بر تخمیر است (Hammes et al., 2005). علاوه بر مقدار کربوهیدرات قابل تخمیر در آرد، ظرفیت بافری، pH و حضور ترکیبات مهارکننده نیز می‌تواند بر ظرفیت اسیدی شدن و رشد میکروارگانیسم‌ها تاثیر بگذارند (Banu et al., 2011). *P. kudriavzevii* مورد مطالعه در این پژوهش، دارای ۷۹/۲۶ درصد قابلیت زنده‌مانی پس از تیمار متوالی اسید و صفرا (مشابه pH پایین معده و حضور نمک صفراوی روده) بود. نتایج مطالعات Perricone و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که مخمر جدا شده از خمیرترش آلتامورا پس از ۳ ساعت نگهداری در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش، تغییرچندانی نکرده و زنده‌مانی قابل قبولی داشت (Perricone et al., 2014). همچنین Palla و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که همه سویه‌های *S. cerevisiae* و *K. humilis* مقاومت بالایی نسبت به شرایط مشابه دستگاه گوارش داشتند در حالی که جمعیت سایر سویه‌ها در این شرایط ۱/۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت (Palla et al., 2019). این میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل pH پایین و نمک‌های صفراوی بوده و فعالیت ضد میکروبی در مقابل عوامل بیماری‌زا و مولد فساد را از خود نشان دادند. همچنین برخی از گونه‌های مخمیری توانایی زنده‌مانی و لانه‌گزینی در دستگاه گوارش را داشته و لذا از قابلیت پروبیوتیکی مناسبی برخوردارند (Pedersen et al., 2012 ; Moslehi Jenabian et al., 2010). از مهم‌ترین عوامل موثر بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش می‌توان به قابلیت تحمل pH پایین، تولید بیوفیلیم، اصلاح فعالیت پمپ پروتونی و هیدرولیز نمک‌های صفراوی اشاره نمود. با قرارگیری باکتری‌ها در معرض نمک‌های صفراوی، اختلالات سلولی رخ می‌دهد که با تجزیه غشای لیپیدی و پروتئین‌های غشای سلولی سبب نشت محتویات سیتوپلاسمی و نهایتاً مرگ سلول می‌شود. هیدرولاز نمک صفراوی و اسید دهیدراتاز صفراوی از جمله آنزیم‌های اساسی میکروبی هستند که با فعالیت خود سبب هیدرولیز نمک صفراوی شده و متعاقباً باعث کاهش سمیت و اثرات جانبی

میکروارگانیزمها به دو صورت خود اتصالی (اتصال سویه‌های هم نوع) و دگر اتصالی (اتصال سویه‌های متفاوت) بررسی می‌گردد. اتصال سویه‌های هم نوع، سبب مسدود شدن جایگاه اتصال عوامل بیماری‌زا شده و عموماً موجب بهبود اتصال آنها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، لانه‌گزینی و محافظت از دستگاه گوارش می‌شود (Janković et al., 2012). به خود اتصالی در مخمرها اغلب فلوکولاسیون گفته می‌شود که در پی کاهش کربوهیدرات‌ها در طول فاز سکون یا تأخیر رشد آنها رخ می‌دهد. سلول‌های مخمری از باکتری‌ها بزرگ‌تر و سنگین‌تر بوده و در نتیجه، نقش پررنگ‌تر و عمل سریع‌تری در لانه‌گزینی دارند. البته این عملکرد به جنس، گونه و نژاد آنها وابسته بوده و به برخی عوامل مانند خصوصیات فیزیکی‌وشیمیایی و ماکرومولکول‌های سطح سلول، ترکیبات مختلف دیواره سلولی، حضور Ca^{2+} و مانوز در محیط نیز بستگی دارد (Gil-Rodriguez et al., 2015).

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، جدایه مخمری دارای ۶۷/۴ درصد قابلیت خود اتصالی بود که در مقایسه با پروبیوتیک‌های تجاری به نسبت قابل توجه می‌باشد. نتایج حاصل از پژوهش Fernandez-Pacheco و همکاران (۲۰۱۸) افزایش میزان خود اتصالی جدایه‌های مخمری را بین ۸۸/۰۱-۲۵/۹۳ درصد در حین گرمخانه‌گذاری نشان داد (Fernandez-Pacheco et al., 2018). Sakandar و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که مخمرها نسبت به باکتری‌ها، میزان خوداتصالی بیشتری دارند و سویه‌های *W. anomalous* ۶۴/۳۴-۶۰/۸۵ درصد خوداتصالی داشتند (Sakandar et al., 2018). Fadda و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی سویه‌های مختلف *Kluyveromyces* در مقایسه با نمونه شاهد که *Saccharomyces boulardii* با ۸۱/۵ درصد خود اتصالی بود، دریافتند که *Kluyveromyces lactis* با حدود ۵۹/۲ درصد نسبت به *K. marxianus* با ۴۴/۵ درصد، میزان خود اتصالی بالاتری داشت (Fadda et al., 2017).



شکل ۳- اثر ضد قارچی مخمر *Pichia kudriavzevii* جدا شده از خمیر ترش باکویت به روش کشت دو لایه: الف) نمونه کنترل حاوی *A. niger* (ب) اثر ضد قارچی جدایه مخمری در برابر *A. niger* (ج) نمونه کنترل حاوی *A. flavus* (د) اثر ضد قارچی جدایه مخمری در برابر *A. flavus*.
Fig. 3. Antifungal activity of *Pichia kudriavzevii* isolated from buckwheat sourdough in overlay bioassay: A: control sample containing *A. niger*, B: antifungal activity of the yeast isolate against *A. niger*, C: control sample containing *A. flavus*, D: antifungal activity of the yeast isolate against *A. flavus*.

دادند که دو جدایه مخمری از خمیر ترش آلتامورا، ۹۶/۹۶ و ۶۰ درصد آبگریزی داشتند (Perricone et al., 2014). بر اساس نتایج بررسی Ciafardini و Zullo (۲۰۱۹) میزان آبگریزی مخمرهای *Candida adriatica* و *Yamadazyma terventina* به ترتیب ۵۵/۵۰ و ۴۵/۵۰ درصد بود (Zullo and Ciafardini, 2019). Ilavenil و همکاران

همچنین در پژوهش حاضر مشخص گردید که جدایه مخمری، ۶۴/۰۷ درصد آبگریزی داشت. نتایج پژوهش Fadda و همکاران (۲۰۱۷) مشخص نمود که میزان آبگریزی سویه‌های مختلف *Kluyveromyces* در محدوده ۷۹/۴-۳۹/۹ درصد متفاوت بود (Fadda et al., 2017). Perricone و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان

همه جدایه‌های مخمری، منفی گزارش شد (Fadda et al., 2017). در مطالعه Suvarna و همکاران (۲۰۱۸) نیز هیچ کدام از جدایه‌های مخمری شامل *Pichia barkeri*، *Yarrowia lipolytica*، *S. cerevisiae* و *W. anomalous* فعالیت همولیزی نداشتند (Suvarna et al., 2018). به‌طور کلی سه نوع فعالیت همولیزی آلفا، بتا و گاما شناخته شده است. مشاهده هاله سبز رنگ در محیط کشت خوندار، نشانگر فعالیت همولیزی آلفا بوده و هاله زرد رنگ، همولیز نوع بتا را نشان می‌دهد. اما طی همولیز نوع گاما هیچ‌گونه تغییر رنگی در محیط کشت مشاهده نمی‌شود. مخمرها به‌علت فقدان ژن‌های انتروتوکسین‌زای همولیتیک، عدم تولید توکسین‌های تجزیه‌کننده خون و عدم آسیب به غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های قرمز خون، اغلب فعالیت همولیزی ندارند (Angmo et al., 2016).

جدایه مخمری مورد مطالعه در پژوهش حاضر، دارای اثر ضدقارچی بر روی *A. niger* و *A. flavus* بود. بر اساس نتایج پژوهش Fakruddin و همکاران (۲۰۱۷) که بر روی سویه‌ای از مخمر *S. cerevisiae* انجام گرفت، مشخص گردید که مخمر مذکور، فعالیت ضدقارچی در برابر *Aspergillus astus*، *A. niger* و *Rhizopus* و *Aspergillus ocrasus* و *Pichia cryzogenum* داشت که البته بیشترین اثر بازدارنده آن بر روی *A. niger* کمترین اثر ضدقارچی آن بر *A. astus* مشاهده شد (Fakruddin et al., 2017). همچنین La Penna و همکاران (۲۰۰۴) ضمن ارزیابی فعالیت بازدارندگی *Kluyveromyces*‌های جدا شده بر سویه‌های *Aspergillus flavi* نشان دادند که مخمرهای مذکور بر روی سویه‌های *Aspergillus* فعالیت بازدارندگی بین ۷۵-۱۰۰ درصد داشته و در فعالیت‌های آبی مختلف، اثرات بازدارندگی متفاوتی از خود نشان دادند (La Penna et al., 2004). در پژوهش Ruggirello و همکاران (۲۰۱۹) نیز اثرات ضدقارچی پنج مخمر جدا شده از محصولات تخمیری برای تعیین توانایی بازدارندگی *Aspergillus carbonarius* و *Aspergillus carbonarius* و *Hanseniaspora* گرفت و مشخص شد که مخمرهای *Kluyveromyces*، *Pichia fermentas*، *Kazachstania* و *hellenica* در فعالیت آبی ۰/۹۵ و جمعیت قارچ ۱۰^۲ اسپور در میلی‌لیتر و جمعیت مخمری ۱۰^۵ کلنی در میلی‌لیتر دارای ۹۳-۶۱ درصد اثر ضدقارچی بودند. در واقع، تولید متابولیت‌هایی مانند دی‌اکسید کربن، اتانول، ترکیبات پروتئینی یا پپتیدهای با وزن مولکولی پایین و ترکیب این عوامل در اثرات ضد قارچی گونه‌های مخمری موثر هستند (Kapetanakou et Ruggirello et al., 2019; al., 2012). از سایر مکانیسم‌های موثر در خاصیت ضدقارچی مخمرها می‌توان به تولید نوعی توکسین کشنده مانند آنتی‌بادی در

(۲۰۱۶) گزارش کردند که آبگریزی حدود ۴۰-۳۰ درصد می‌تواند بیانگر قدرت پروبیوتیک‌ها برای واکنش با موکوس و ایجاد حداقل یک اتصال کوتاه و ناپایدار باشد (Ilavenil et al., 2016).

طی پژوهش حاضر مشخص گردید که جدایه مخمری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، مقاوم و نسبت به آنتی‌مایکوتیک‌های ایتراکونازول و ناتامایسین، نیمه حساس و در برابر فلوکونازول و کتوکونازول، مقاوم بود. از جمله سازوکارهای مخمرها برای مقاومت در برابر ترکیبات ضدقارچ خانواده آزول می‌توان به تغییر یا اصلاح نفوذپذیری غشاء سلول و تغییر جایگاه هدف اشاره کرد (Kanafani and Perfect., 2008). Perricone و همکاران (۲۰۱۴) پس از ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مخمری نوعی خمیرترش شامل *S. cerevisiae* و *Candida humilis* دریافتند که گونه‌های *Candida* نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده مقاوم بودند. مخمرها به‌طور طبیعی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده و فقدان ماده ژنتیکی به‌منظور انتقال بین باکتری و مخمر، آن‌ها را به انتخاب مناسبی برای کاربردهای پروبیوتیکی تبدیل نموده است (Fadda et al., 2017; Perricone et al., 2014). بر اساس گزارش Banik و همکاران (۲۰۱۹)، سویه‌ای از مخمر *S. cerevisiae* نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مقاوم بوده و هیچ هاله حساسیتی ایجاد نکرد اما در مقابل عوامل ضدقارچی مانند فلوکونازول و کلوتریمازول به‌ترتیب، هاله حساسیت ۲۳ و ۲۰ میلی متری ایجاد نمود (Banik et al., 2019). در پژوهش Fekri و همکاران (۲۰۲۰) مشخص گردید که از بین جدایه‌های مخمری مورد مطالعه، *K. marxianus* نسبت به چهار ترکیب آنتی‌مایکوتیک وریکونازول، کتوکونازول، فلوکوتوزین و ایتراکونازول، حساسیت متوسط نشان داد درحالی‌که *K. lactis* و *Kluyveromyces aestuarii* در مقابل فلوکوتوزین و آمفوتریسین مقاوم بودند (Fekri et al., 2020). در رابطه با سازوکارهای مخمرها برای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به تغییر یا اصلاح نفوذپذیری غشاء سلول، بازدارندگی سنتز پروتئین‌های میتوکندریایی، جهش و کاهش فعالیت‌های تجزیه ATP اشاره کرد. مقاومت در برابر آنتی‌مایکوتیک‌ها نیز ممکن است ناشی از بازدارندگی سنتز RNA و DNA سلولی، تغییر جایگاه هدف ترکیب آنتی‌مایکوتیک، ممانعت از سنتز استرول‌ها و صدمات مستقیم غشایی، تحریک سیستم پمپ پروتونی در غشاء سلول، فعالیت پمپ افلاکس (سیستم انتشار یون‌ها و یا نحوه انتقال آنها) و یا تداخل در فرایند بیان ژن باشد (Goretti et al., Kanafani and Perfect., 2014).

جدایه مخمری مورد مطالعه در پژوهش حاضر، فاقد هر گونه فعالیت همولیزی بود. طی پژوهش مشابهی نتیجه همولیز خون توسط

متوالی اسید و صفرا را داشت. همچنین جدایه مذکور، دارای قابلیت های خود اتصالی و آبگریزی، مقاومت آنتی بیوتیکی و آنتی مایکوتیکی مناسب و اثرات ضدباکتریایی و همچنین فعالیت ضدقارچی جالب توجهی بود. بنابراین، جدایه *P. kudriavzevii* از قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک و یا محافظت کننده در صنایع تخمیری برخوردار می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

بدن انسان، در مجاورت قارچ ها اشاره کرد که با گیرنده های دیواره سلولی واکنش داده و به طور ویژه بر سلول های حساس که از جنس گلوکان هستند اثر می گذارند. به عنوان مثال، می توان به تولید توکسین KT از سویه های منتخب *Pichia anomala* و زیگوسین حاصل از مخمر *Zygosaccharomyces bailii* به عنوان ممانعت کننده کامل از رشد *Colletotrichum* و *Fusarium oxysporum* *graminicola* اشاره کرد (Magliani et al., 2019; Banik et al., 2019; al., 2005).

در پژوهش حاضر، خصوصیات پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر جدا شده از خمیرترش باکویت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این پژوهش، جدایه *P. kudriavzevii* توانایی زنده ماندن پس از تیمار

منابع

1. AACC, International. (2010). Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.
2. Ahmed, A., Khalid, N., Ahmad, A., Abbasi, N. A., Latif, M. S. Z., Randhava, M. A. (2014). Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat. a review. *The Journal of Agricultural Science*, 152 (3), 349–369. <https://doi.org/10.1017/S0021859613000166>
3. Andrabi, S. T., Bhat, B., Gupta, M., Bajaj, B. K. (2016). Phytase-producing potential and other functional attributes of lactic acid bacteria isolates for prospective probiotic applications. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(3), 121-129. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9220-3>
4. Angelov, A., Gotcheva, V., Hristozova, T., Gargova, S. (2005). Application of pure and mixed probiotic lactic acid bacteria and yeast cultures for oat fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (12), 2134–2141. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2223>
5. Angmo, K., Kumari, A., Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057>
6. Arroyo López, F. N., Romero Gil, V., Bautista Gallego, J., Rodriguez Gomez, F., Jimenez Diaz, R., García García, P., Garrido Fernandez, A. (2012). Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing. *Frontiers in Microbiology*, 3, 161. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00161>
7. Bajaj, B. K., Claes, I. J., Lebeer, S. (2021). Functional mechanisms of probiotics. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 321-327.
8. Banik, A., Mondal, J., Rakshit, S., Ghosh, K., Sha, S. P., Kumar, Halder, S., Ghosh, C., Mondal, K. C. (2019). Amelioration of cold-induced gastric injury by a yeast probiotic isolated from traditional fermented foods. *Journal of Functional Foods*, 59, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.039>
9. Banu, I., Vasilean, I., Aprodu, I. (2011). Effect of select parameters of the sourdough rye fermentation on the activity of some mixed starter cultures. *Food Biotechnology*, 25(4), 275-291. <https://doi.org/10.1080/08905436.2011.617251>
10. Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. (2012). Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00194>
11. Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Prabhu, P. R., Antony, U. (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401. <https://doi.org/10.1002/yea.3181>
12. Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics: *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
13. De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>
14. Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.020>

15. Fakruddin, M. D., Nur Hossain, M. D., Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1591-9>
16. Fekri, A., Torbati, M. A., Yari Khosrowshahi, A., Bagherpour Shamlood, H., Azadmard- Damirchi, S. (2020). Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. *Food Chemistry*, 306, 125620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125620>
17. Fernandez-Pacheco, P., Arevalo-Villena, M., Bevilacqua, A., Corbo, M., Beriones Perez, A. (2018). Probiotic characterization in *Saccharomyces cerevisiae* strains: application in food industries. *LWT-Food Science and Technology*, 97, 332-340. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.007>
18. García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Iglesias, A. E., Pérez-Sanchez, T., Salabarría, R. B., Halaihel, N. (2012). Identification and *in vitro* screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 798-802. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.005>
19. Gil-Rodriguez, A. M., Carrascosa, A. V., Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: *In vitro* characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.042>
20. Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E., Corazzi, I., Vaughan-Martini, A., Buzzini, P. (2009). *In vitro* antimycotic activity of a Williopsis saturnus killer protein against food spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.013>
21. Greppi, A., Krych, L., Costantini, A., Rantsiou, K., Hounhouigan, D. J., Arneborg, N. (2015). Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.011>
22. Greppi, A., Saubade, F., Botta, C., Humblot, C., Guyot, J.P., Cocolin, L. (2017). Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiology*, 62, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.016>
23. Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter M. F., Vogelmann, S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.010>
24. Ilavenil, S., Vijayakumar, M., Kim, D. H., Valan Arasu, M., Park, H. S., Ravikumar, S., Choi, K. C. (2016). Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian ryegrass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 593-601. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7128>
25. Janković, T., Frece, J., Abram, M., Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 6(1), 19-24.
26. Kanafani, Z. A., Perfect, J. R. (2014). Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), 120-128. <https://doi.org/10.1086/524071>
27. Kapetanakou, A. E., Kollias, J. N., Drosinos, E. H., Skandamis, P. N. (2012). Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.010>
28. La Penna, M., Nesci, A., Etcheverry, M. (2004). *In vitro* studies on the potential for biological control on *Aspergillus section Flavi* by *Kluyveromyces* spp. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 257-264. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2003.01467.x>
29. Magliani, W., Conti, S., Frazzi, R., Ravanetti, L., Maffei, D. L., Polonelli, L. (2005). Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. *Current Molecular Medicine*, 5(4), 443-452. <https://doi.org/10.2174/1566524054022558>
30. Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 129-135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7)
31. Maia Danielski, G., Didimo Imazaki, P. H., Daube, G., Emlund Freitas de Macedo, R., Clinquart, A. (2017). *In vitro* evaluation of the competing effect of *Carnobacterium maltaromaticum* isolated from vacuum packed meat against food pathogens. BAMST Symposium: Meet the Belgian Meat Researchers, Melle 7th.
32. Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5(2), 65-71. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>
33. Montville, T. J., Matthews, K. R. (2012). Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, 1-18. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch1>

34. Moroni, A., Arendt, E., Dal Bello, F. (2011). Biodiversity of lactic acid bacteria and yeast in spontaneously fermented buckwheat and teff sourdough. *Food Microbiology*, 28(3), 497-502. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.016>
35. Moroni, A.V., Zannini, E., Sensidoni, G., Arendt, E. K. (2012). Exploitation of buckwheat sourdough for the production of wheat bread. *European Food Research and Technology*, 235(4), 659-668. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1790-z>
36. Moslehi Jenabian, S., Lindegaard, L., Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2(4), 449-473. <https://doi.org/10.3390/nu2040449>
37. Ng, K. R., Lyu, X., Mark, R., Chen, W. N. (2019). Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. *Food Chemistry*, 270, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.077>
38. Palla, M., Agnolucci, M., Calzone, A., Giovannetti, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Pontonio, E. (2019). Exploitation of autochthonous Tuscan sourdough yeasts as potential starters. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.004>
39. Pedersen, L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., Jespersen, L. (2012). Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.016>
40. Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M., Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.006>
41. Rima, H., Steve, L., Ismail, F. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>
42. Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 234-240. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.007>
43. Rolim, F. R. L., dos Santos, K. M. O., de Barcelos, S. C., do Egito, A. S., Ribeiro, T. S., da Conceição, M. L. (2015). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 807-813. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.004>
44. Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., Cocolin, L., Dolc, P. (2019). Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115, 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.002>
45. Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
46. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
47. Sakandar, H. A., Usman, K., Imran, M. (2018). Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *LWT-Food Science and Technology*, 91, 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.023>
48. Suvarna, S., Dsouza, J., Ragavan, M. L., Das, N. (2018). Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Food Science and Biotechnology*, 27(3), 745-753. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0310-8>
49. Viljoen, B. C. (2006). Yeast ecological interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In *Yeasts in food and beverages* (pp. 83-110). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_4
50. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 18(1): 315-322.
51. Zhu, F., (2016). Chemical composition and health effects of Tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 20, 231-245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.050>
52. Zielinski, H., Szawara-Nowak, D., Baczek, N., Wronkowska, M. (2019). Effect of liquid-state fermentation on the antioxidant and functional properties of raw and roasted buckwheat flours. *Food Chemistry*, 271, 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.182>
53. Zullo, B.A., Ciafardini, G. (2019). Evaluation of physiological properties of yeasts strains isolated from olive oil and their *in vitro* probiotic trait. *Food Microbiology*, 78, 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.016>



Detection of *Salmonella* spp. in raw chicken products using specific primer-probe set by Real time-PCR method

Kobra Tajik Toughan¹, Mohammadreza Edalatian Dowom^{2*} , Seyed Ali Mortazavi³, Ali Javadmanesh⁴

Received: 2021.12.13

Revised: 2022.01.28

Accepted: 2022.02.06

Available Online: 2022.02.06

How to cite this article:

Tajik Toughan, K., Edalatian Dowom, M. Mortazavi, S. A. Javadmanesh, A. (2022). Detection of *Salmonella* spp. in raw chicken products using specific primer-probe set by Real time-PCR method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 589-601.

Abstract

Introduction: Poultry and meat products are the largest sources of non-typhoid salmonella infections in most countries. Studies have shown that raw foods of animal origin, especially poultry and its products, are the main source of contamination of kitchens and restaurants. In terms of growth conditions, these microorganisms are resilient bacteria and easily adapt to their environmental conditions. *Salmonella* has been known to cause intestinal disease for many years and has been reported as the most important cause of food poisoning. According to Iranian and international standards, there should be no *S. enteritidis* or *S. typhimurium* in 25 grams of food. DNA-based methods for the identification and differentiation of *Salmonella* serovars have been designed and applied using specific primers at the genus and serovar levels. Therefore, they can be used as useful and rapid screening tests, as well as to supplement or replace conventional biochemical and serological tests. Real-time PCR, with the most accurate and reliable results using a fluorescence probe, which of course has a high cost. In this method, sequence specific fluorescence probes are used, and as a result, in the target molecule, screening and determination the presence or even the concentration of specific sequences is possible. Therefore, even in the presence of other types of nucleic acid molecules, the results are obtained quickly and have a high level of specificity. Under these conditions, if specific probes with different fluorescence dyes are used, even multiple targets can be detected in a single PCR reaction. The aim of this study was to identify *S. enteritidis* or *S. typhimurium* by PCR and *Salmonella* spp. by real time PCR method in poultry products.

Material and Method: In total, 45 samples of poultry products, including chicken breast, liver and gizzard (15 samples each) were purchased from different regions of Mashhad and from various companies and transferred to the laboratory in accordance with hygienic standards. For each sample, 25 g of tissue was isolated and homogenized under sterile conditions and DNA extraction was then performed using a DNA extraction kit. The extracted DNA was evaluated by agarose gel electrophoresis. The purity and quantity of DNA extracted from each sample was examined by spectrophotometry method. In the next step, in order to identify the genus *Salmonella*, the samples were examined by real time PCR. In this method we used an internal control to ensure that negative results are not false negative due to inhibitors. The results of real time PCR showed that out of 45 samples, nine samples were infected with *Salmonella*. Then, these nine samples were evaluated for *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* infection by conventional PCR method.

1. Graduated MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Corresponding Author: edalatian@um.ac.ir

3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

4. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

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

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.74447.1129](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74447.1129)

Result and Discussion: The results showed that out of nine samples that were positive in real time PCR test, seven samples were contaminated with *Salmonella typhimurium*, of which five samples were related to chicken breast and two to liver. Regarding *Salmonella enteritidis* infection, out of nine samples, only one sample was contaminated, which was related to chicken breast. Conventional methods have been traditionally used to enumerate target bacteria in food. However, these methods have some limitations and require considerable time and labor. Previous studies have already shown that real time PCR is more effective than conventional bacteriological methods for the detection of *Salmonella* spp. In a study by Whyte et al. (2002) The presence of *Salmonella* was assessed by traditional culture methods and by a *Salmonella*-specific polymerase chain reaction (PCR) test. *Salmonella* was recovered from 16% of samples using traditional culture methods. In contrast, the PCR assay proved to be more sensitive and detected *Salmonella* DNA in 19% of the examined samples (Whyte et al. 2002). Results of PCR with specific primers showed that reactions in real time PCR with general primers of *Salmonella* spp. were done correctly. Despite of accuracy and speed of real time PCR to detect DNA of microorganisms, further studies are developed to have more advantages. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) showed a higher sensitivity of *Salmonella* detection in compare to qPCR (Vichaiabun & Kanchanaphum, 2020). Although LAMP could detect trace amount of *Salmonella* DNA but primer design for this reaction is very difficult. However, it is important to highlight that non-viable cells can be detected by real time PCR or other DNA-based methods, which does not occur in traditional methods of culture and isolation that require viable cells for quantification (Zeng et al., 2016).

Keywords: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, Chicken breast, Real time PCR.

مقاله علمی-پژوهشی

شناسایی گونه‌های سالمونلا در فرآورده‌های خام مرغ با استفاده از کاوشگر اختصاصی به کمک

روش Real Time PCR

کبری تاجیک طوغان^۱ - محمدرضا عدالتیان دوم^{۲*} - سید علی مرتضوی^۳ - علی جوادمنش^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، شناسایی گونه‌های سالمونلا در فرآورده‌های مرغ با تکیه بر روش Real time PCR است. بدین منظور، تعداد ۴۵ نمونه از فرآورده‌های ماکیان که شامل سینه، کبد و سنگدان مرغ بودند از نقاط مختلف شهر مشهد و از شرکت‌های گوناگون خریداری و با رعایت موازین بهداشتی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. طبق استانداردهای ایران و بین‌المللی، در ۲۵ گرم از ماده غذایی، نباید هیچ سالمونلایی وجود داشته باشد. بدین منظور، ۲۵ گرم از هر یک از نمونه‌ها جدا شده و تحت شرایط استریل به‌خوبی هموژن شدند و استخراج DNA صورت گرفت. به‌منظور تایید، DNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. خلوص و کمیت DNA استخراج شده هر یک از نمونه‌ها توسط طیف‌سنجی نوری مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد به‌منظور شناسایی جنس سالمونلا، نمونه‌ها توسط روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که از مجموع ۴۵ نمونه، ۹ نمونه آلوده به جنس سالمونلا می‌باشد. سپس این ۹ نمونه، از نظر آلودگی به گونه‌های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس مورد ارزیابی قرار گرفتند که برای این منظور از روش PCR معمولی استفاده شد. نتایج نشان داد از تعداد ۹ نمونه که در تست Real time PCR مثبت تشخیص داده شده بود، تعداد ۷ نمونه آلوده به سالمونلا تیفی موریوم بوده که از این ۷ نمونه، ۵ مورد مربوط به سینه مرغ و ۲ مورد مربوط به کبد بود و از نظر آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس از تعداد ۹ نمونه، تنها یک نمونه آلوده بود که مربوط به سینه مرغ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس، گوشت مرغ، Real Time PCR.

مقدمه

سالمونلوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی با منشأ مواد غذایی در جهان می‌باشد که در اکثر نقاط مختلف دنیا به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Azizpour and Ghazaei, 2019). سالمونلاها سالهاست که عامل بیماری روده‌ای شناخته شده‌اند و به‌عنوان مهم‌ترین عامل مسمومیت غذایی قابل گزارش مطرح هستند (Alcamo, 1997). در میان این سروتیپ‌ها، سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم^۵ متداولترین عامل سالمونلوز در انسان می‌باشد اما این احتمال وجود دارد که در آینده نزدیک این نسبت به نفع سالمونلا انتریتیدیس^۶ تغییر کند. چرا که عفونت‌های ناشی از این باکتری در اکثر کشورهای جهان رو به افزایش است. شواهد موجود نشان می‌دهد که مصرف تخم‌مرغ و گوشت مرغ آلوده با سالمونلا

مرغ و فراورده‌های گوشتی بزرگترین منابع عفونت‌های سالمونلایی غیرتیفوئیدی در اکثر کشورهای دنیا می‌باشند. مطالعات نشان داده که مواد غذایی خام با منشأ دامی به‌ویژه طیور و فراورده‌های آن منبع اصلی آلودگی آشپزخانه‌ها و رستوران‌ها است (Mortazavi et al., 1993; Le Minor, 1981). باکتری‌های جنس سالمونلا گرم منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، باسیلی شکل به اندازه ۵-۲×۱/۵-۰/۷ میکرون هستند که خصوصیات عمومی خانواده انتروباکتریاسه را دارا می‌باشند. از لحاظ شرایط رشد این میکروارگانیسم‌ها باکتری‌های انعطاف‌پذیری بوده و به آسانی با شرایط محیطی خود را هماهنگ می‌کنند.

* نویسنده مسئول: Email: edalatian@um.ac.ir

DOI: 10.22067/iftstrj.2022.74447.1129

5 *S.typhimurium*

6 *S.enteritidis*

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

سالمونلا/اینفنتیس، ۲۲ درصدی سالمونلا تیفی موریوم و ۳۲ درصدی سالمونلا/انتریتیدیس بود (Moghadam et al., 2017).

تکنیک Real-time PCR، دقیق ترین و قابل اعتمادترین نتایج با استفاده از کاوشگر فلورسانس به دست می آید که البته هزینه زیادی نیز دارد. در این روش از کاوشگرهای DNA یا RNA اختصاصی استفاده می شود و در نتیجه در مولکول هدف، جستجو و تعیین غلظت برای توالی های خاص امکان پذیر می گردد. بنابراین حتی در حضور سایر انواع مولکول های اسید نوکلئیک، نتایج حاصل از نظر اختصاصی بودن، در حد بالایی است. در این شرایط، چنانچه از کاوشگرهای اختصاصی با رنگ های مختلف استفاده شود، حتی می توان ژن های متعددی را در یک واکنش PCR، مورد بررسی قرار داد (Navarro et al., 2015).

Morsali و همکاران (۲۰۱۷) به منظور بهینه سازی و تشخیص همزمان سالمونلا و اشرشیا در فرآورده های گوشتی و بررسی میزان آلودگی آنها با روش PCR چندگانه^۲ تحقیقاتی انجام دادند. تعداد ۷۴ نمونه گوشت به طور تصادفی از نواحی مختلف استان زنجان جمع آوری شد. نتایج نشان داد که از بین ۷۴ نمونه گوشتی، تعداد ۶ نمونه به اشرشیا، تعداد ۴ نمونه به سالمونلا و تعداد ۲ نمونه به هر دو باکتری آلوده بودند. آزمایش PCR چندگانه در تشخیص همزمان هر دو پاتوژن در کمترین رقت تلقیح شده به نمونه های گوشتی نیز از حساسیت بالایی برخوردار بود. در این مطالعه آزمایش PCR چندگانه بر اساس ژن های بیماری زایی سالمونلا و اشرشیا جهت تشخیص سریع و همزمان این پاتوژن ها با حساسیت و اختصاصیت بالا بهینه سازی شد. واکنش PCR چندگانه به منظور شناسایی همزمان پاتوژن های انتقال یافته از راه غذا در کنترل آلودگی های مواد غذایی روش قابل اعتمادی است (Morsali et al., 2017). Cheng و همکاران (۲۰۰۸) توسط روش Real-time PCR به شناسایی سالمونلا در نمونه های مختلف غذایی از جمله: غذاهای خشک و غذاهای دریایی پرداختند. برای این منظور ۴۲۰ نمونه تهیه شد و پس از استخراج DNA از نمونه ها، شناسایی سالمونلا توسط Real-time PCR انجام شد. نتایج نشان داد که ۳۷ نمونه از ۴۲۰ نمونه آلوده به سالمونلا می باشد (Cheng et al., 2008). Siala و همکاران (۲۰۱۷) توسط روش Real-time PCR به شناسایی سالمونلا در نمونه های مختلف غذایی پرداختند. ۵۰۰ نمونه غذا به طور تصادفی از سوپرمارکت های مختلف طی ۴ ماه جمع آوری شد. این نمونه ها شامل: غذاهای پخته شده، شیر، محصولات لبنی، میوه های تازه و سبزیجات، غذاهای دریایی، گوشت خام مرغ، انواع کیک ها می باشند. نتایج نشان داد که ۲۵ نمونه (۵ درصد) از آنها آلوده به سالمونلا بودند. گونه های سالمونلا در گوشت خام مرغ ۲۷/۴۵ (۶۰ درصد)، شیر ۳۱/۹۳ (۳۳/۳ درصد)، گوشت قرمز خام ۵/۱۳ (۳۸/۵ درصد) و ماهی ۱۱/۴۶ (۹/۲۳ درصد)،

انتریتیدیس عامل اصلی این افزایش می باشد (Liljebjelke et al., 2005). در سال ۲۰۱۳، ۸۲۶۹۴ مورد سالمونلوسیس در اروپا بر اساس آمار و اطلاعات مرکز کنترل و پیشگیری بیماری اروپا (ECDC^۱) گزارش شد. بر اساس گزارش اخیر، سالمونلا/انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار/انتریتیدیس و سالمونلا/انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار تیفی موریوم بیشترین گونه های گزارش شده بودند که به ترتیب ۳۹/۵٪ و ۲۰/۲٪ را به خود اختصاص داده بودند (EFSA & ECDC, 2015). در سال ۲۰۱۱، قوانین اتحادیه اروپا، ۲۰۷۳/۲۰۰۵، (EC, 2005) اصلاح شد. بدین صورت که معیار عدم وجود گونه های سالمونلا در ۲۵ گرم از گوشت تازه ماکیان به وسیله معیار عدم وجود *S. Enteritidis* و *S. Typhimurium* در ۲۵ گرم از گوشت تازه ماکیان "جایگزین شد. روش های تکثیر DNA برای شناسایی و افتراق سرووارهای سالمونلا، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در سطح جنس و سرووار طراحی شده و مورد مطالعه گرفته اند. از جمله سرووارهای مهم سالمونلا، سالمونلا/انتریتیدیس، سالمونلا پلوروم، سالمونلا گالیناروم و سالمونلا دابلین می باشد. تکنیک های تکثیر DNA بر روی نواحی ژنومیک اختصاصی سرووارهای سالمونلا، قادر به شناسایی و تفریق سرووارهای بالینی سالمونلا مهم می باشند، بنابراین می توان از آنها به عنوان آزمایش های مفید و سریع غربالگری و نیز در جهت تکمیل و یا جایگزین آزمایش های بیوشیمیایی و سولوژیکی استفاده نمود (Bejai et al., 2019).

Rad و همکاران (۲۰۰۸) شناسایی گونه های مختلف سالمونلا در مرکز اصلاح و پرورش مرغ بومی را مورد بررسی قرار دادند. نمونه هایی از بخش های مختلف سالن مرغ مادر، سالن جوجه کشی، سالن جوجه های زیر یک هفته و نیز از تخم مرغ جمع آوری گردید. درصد آلودگی به سالمونلا در ۴ سالن مرغ مادر ۶۴/۱ درصد و در زرده تخم مرغ ها و نیز پوسته ۹۲/۱ درصد بود. از نمونه های مربوط به سالن جوجه کشی و سالن جوجه های زیر یک هفته، باکتری سالمونلا جدا نشد. در مجموع تعداد ۷ نمونه آلوده به سالمونلا بوده و تمام این نمونه ها متعلق به گروه D بودند. آزمایش PCR برای تایید تشخیص جنس سالمونلا و نیز تعیین گونه صورت گرفت. تمام گونه ها به عنوان *S. enteritidis* تشخیص داده شدند (Rad et al., 2008).

Moghadam و همکاران (۲۰۱۷) به شناسایی و بررسی سروتیپ های سالمونلا تیفی موریوم، اینفنتیس و انتریتیدیس در نمونه های بالینی از مراکز درمانی سطح استان کرمان پرداختند. با استفاده از روش PCR حضور جنس سالمونلا با تکثیر ژن *invA* در ۱۳۰ نمونه از ۱۳۲ نمونه تأیید شده سالمونلا باروش های میکروبی و تست های بیوشیمیایی (۹۸ درصد) تأیید گردید. همچنین نتایج نشان دهنده شیوع ۱۹ درصدی

انتقال داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد (Monadi et al., 2013).

نمونه‌برداری از بافت‌های حیوانی

تعداد ۴۵ نمونه که شامل بافت سینه مرغ، کبد مرغ و سنگدان مرغ می‌باشد از مراکز فروش مختلف، و از برندهای گوناگون اعم از (یادگار، مک توس، کاکلی، آریا پروتئین، پاک، رضوان، سپید گوشت) از شهر مشهد جمع‌آوری شدند و با رعایت موازین بهداشتی به آزمایشگاه منتقل شدند. در مرحله بعد مقدار ۲۵ گرم از هر یک از نمونه‌ها جدا شده و توسط هاون و بوته چینی به خوبی هم‌زَن شد.

استخراج DNA از باکتری سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا

انتریتیدیس

بدین منظور از کیت استخراج DNA (High Pure PCR Template Preparation، شرکت Roche، آلمان) براساس دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد.

استخراج DNA از بافت

برای استخراج DNA از بافت، در این پژوهش از کیت استخراج DNA از بافت (Tissue DNA Extraction kit) شرکت پارس توس استفاده شد.

ارزیابی DNA استخراج شده

به‌منظور بررسی وجود شکستگی در DNA استخراج شده از نمونه‌ها، توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و خلوص و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش Real time PCR

برای فعال‌سازی کنترل مثبت ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق‌کننده به ویال حاوی کنترل مثبت اضافه شد و به‌منظور فعال‌سازی کنترل منفی ۵ میکرولیتر از بافر رقیق‌کننده به ویال کنترل منفی نیز اضافه شد. واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. محتویات ویال حاوی مستر میکس PCR با محتویات ویال حاوی PCR Assay مخلوط شده و ۵ میکرولیتر از آن به همه میکروتیوب‌ها اضافه شد. در مرحله بعد به جز میکروتیوب حاوی کنترل مثبت ۳ میکرولیتر آب به هر یک از میکروتیوب‌ها اضافه شد. سپس ۲ میکرولیتر از هر یک از DNA نمونه‌ها به میکروتیوب‌ها اضافه شد (جدول ۱). این مراحل در ۴۰ سیکل

درصد) بود. همچنین شیوع بیماری سالمونلا در کیک، لبنیات، غذاهای پخته، به‌ترتیب ۱۱/۱۴ (۸/۲۶ درصد)، ۲۲/۵ (۲۲/۷ درصد) و ۳۲/۱۵ (۲۱/۳ درصد) در مقایسه با روش کشت بود (Siala et al., 2017).

روش‌های مولکولی متعددی بر پایه کشف DNA سالمونلا، (برای مثال ژن *inv A*) توسعه پیدا کرده‌اند (McGuinness et al., 2010). تکنیک و روش Real-time PCR سریع‌تر و حساس‌تر از روش PCR قراردادی^۱ و داده‌های در زمان واقعی^۲ و بدون استفاده از ژل الکتروفورز برای ما فراهم می‌نماید (Apfalter et al., 2003). ژن‌ها و قطعات هدف مختلفی برای شناسایی و کشف سالمونلا در مواد غذایی استفاده شده است و ژن *inv A* متداول‌ترین ژن مورد استفاده بوده است (Chen et al., 2011). ژن *inv A* کاندیدی خوبی برای کشف و شناسایی سالمونلا می‌باشد و در تمام سرووارهای (سروتیپ‌های) توصیف شده تا این ژن برای توانایی این ارگانیسم جهت تهاجم به سلول‌های پستانداران و ایجاد بیماری لازم و ضروری است (Galán & Curtiss, 1991).

در این پژوهش، بر روی فراورده‌های خام ماکیان (اعم از گوشت، کبد و سنگدان مرغ) تحقیقاتی در جهت شناسایی و کشف باکتری‌های جنس سالمونلا به کمک روش‌های مولکولی، انجام گرفت. نمونه‌های تهیه شده، به روش مولکولی Real Time PCR به‌منظور تایید نهایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. هدف از این مطالعه شناسایی باکتری سالمونلا از محصولات و فراورده‌های گوشت ماکیان و تایید تشخیص آن با استفاده از روش مولکولی Real Time PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA

باکتری‌های سالمونلا / انتریتیدیس (PTCC 1735) و سالمونلا / تایفی موریوم (PTCC1709) به‌عنوان کنترل مثبت تست‌ها، از آزمایشگاه بیوتکنولوژی مولکولی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی تهیه شد. به‌منظور فعال‌سازی، باکتری سالمونلا تیفی موریوم بر روی محیط کشت اختصاصی سالمونلا-شیگلا آگار (Salmonella Shigella Agar) (Saroj et al., 2008) و باکتری سالمونلا / انتریتیدیس بر روی محیط کشت اختصاصی Brain Heart Infusion Agar (BHI) آگار کشت داده شدند (Momtaz et al., 2014). برای آماده‌سازی به‌منظور استخراج DNA هر دو باکتری به‌طور جداگانه به محیط کشت مولر هینتون براث (MUELLER-HINTON broth)

انجام شد. ارزیابی محصولات واکنش Real time PCR طبق راهنمای کیت، بر اساس مشاهده سیگنال فلوئوروسانس انجام گرفت.

جدول ۱- مواد و حجم استفاده شده در واکنش Real time PCR

Table 1- Reagents and volume used in Real time PCR reaction

Component	Sample	Positive PCR Control	Negative PCR Control
Reconstituted mericon Assay (including primers and probe)	5 µl	5 µl	5 µl
Sample DNA & Water	5 µl	—	—
Dissolved Positive Control DNA	—	5 µl	—
QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	—	—	5 µl
Total volume	10 µl	10 µl	10 µl

جدول ۲- برنامه حرارتی واکنش Real time PCR (Borges et al., 2019)

Table 2- Thermal program of Real time PCR reaction

مرحله Stage	درجه حرارت و مدت زمان Temperature and Time
Initial PCR activation step	95°C, 5 min
Denaturation	95°C, 15 Sec
دنا تورا سیون Annealing	60°C, 15 Sec
اتصال پرایمرها Extension	72°C, 10 Sec
طویل سازی	

جدول ۳- مواد و حجم استفاده شده در واکنش PCR

Table 3- Materials and volume used in PCR reaction

Materials	Volume	PCR product طول قطعه <i>S. typhimurium</i>	PCR product طول قطعه <i>S. enteritidis</i>
Master mix	25 µl	107 bp	316 bp
DNA template	3 µl	—	—
Primers	2 µl	—	—
Nuclease free water	20 µl	—	—

نتایج و بحث

نتایج استخراج DNA

متداولترین تکنیک مورد استفاده برای شناسایی و تشخیص سالمونلا، تکنیک میکروبیولوژیکی سنتی است. علی رغم اینکه، این تکنیک دارای استاندارد طلایی می باشد، این روش ها معمولا پرحمت و زمان بر بوده و حداقل نیازمند ۴ تا ۶ روز زمان هستند که باعث افزایش ریسک جذب یا انتقال پاتوژن ها می شود (Andrews and Hammack, 2003). تشخیص سریع، با هزینه موثر و اتوماتیک پاتوژن های غذا-زاد در طول زنجیره مواد غذایی، همچنان به عنوان نگرانی و دغدغه اصلی صنایع و سلامت عمومی ادامه دارد. به دلیل این

واکنش PCR جهت تشخیص باکتری سالمونلا تیفی

موریوم و سالمونلا انتریتیدیس

واکنش ها در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت و هر واکنش شامل ۲۵ میکرولیتر Master mix، ۳ میکرولیتر DNA الگو، ۲ میکرولیتر مخلوط آغازگرها و ۲۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود (جدول ۳). در این واکنش از نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp استفاده شد. تشکیل باند در محدوده ۱۰۷ bp برای باکتری سالمونلا تیفی موریوم و همچنین تشکیل باند در محدوده ۳۱۶ bp برای باکتری سالمونلا انتریتیدیس مورد انتظار می باشد. محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. برنامه مورد استفاده PCR و نیز مشخصات پرایمرها نیز به ترتیب در جدول های ۴ و ۵ درج شده است.

نیازمندی‌ها، PCR به یک ابزار قدرتمند در تشخیص‌های میکروبیولوژیکی در طول دهه اخیر تبدیل شده است (Sachse, 2003). واکنش یک مرحله‌ای در لوله بسته، دارد (Malorny et al., 2004). نسل دوم متدولوژی‌های PCR، real-time PCR، توانایی برآورده کردن تمام این نیازها را، به‌وسیله تکثیر و کشف هم زمان، در یک واکنش یک مرحله‌ای در لوله بسته، دارد (Malorny et al., 2004).

جدول ۴- برنامه PCR
Table 4- PCR program

Steps	Temperature (°C)	Time	Cycle
دنا تورا سیون اولیه Initial Denaturation	94	4 min	1
دنا تورا سیون Denaturation	94	1 min	35
اتصال پرایمرها Annealing	62	30 sec	35
طویل سازی Extension	72	30 sec	35
طویل سازی نهایی Final extension	72	5 min	1

جدول ۵- توالی پرایمرهای باکتری سالمونلا تیفی موریوم (Ben Hassena et al., 2015) و سالمونلا انتریتیدیس (Paião et al., 2013) استفاده شده در

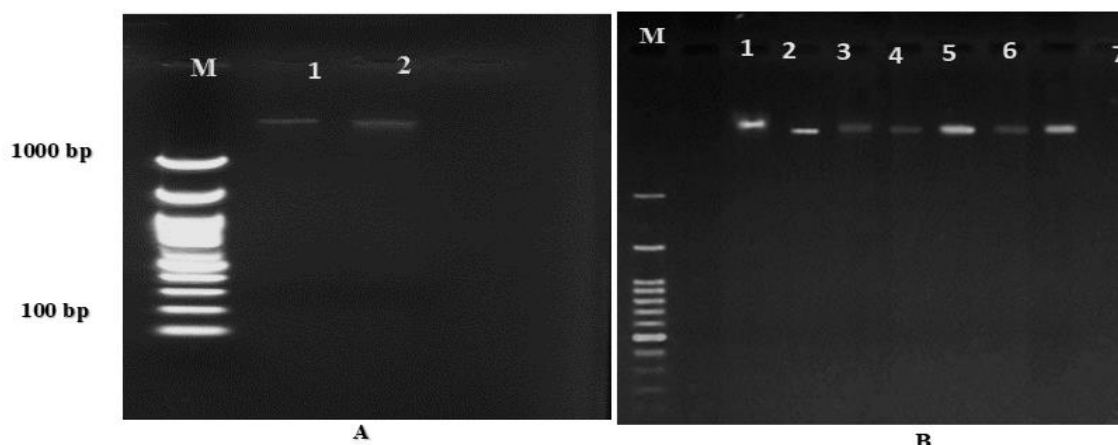
PCR

Table 5- Primers sequences of *Salmonella typhimurium* (Ben Hassena et al., 2015) and *Salmonella enteritidis* (Paião et al., 2013) used in PCR

	Primer pair	Sequence (5'→3')	TM	Length
<i>Salmonella typhimurium</i>	siiA Fw	ACGACTGGGATATGAACGGGGAA	64.7	23
	siiA Rv	TCGTTGTACTTGATGCTGCGGAG	64.7	23
<i>Salmonella enteritidis</i>	IE1 Fw	AGTGCCATACTTTTAATGAC	64	20
	IE1 Rv	ACTATGTCGATACGGTGGG	64	19

ها را پیشنهاد می‌کند، ایراد اصلی این روش، عدم توانایی آن در ارزیابی زنده‌مانی سول‌ها، به دلیل حضور DNA در سلول‌های مرده می‌باشد، در صورتی که روش‌های مبتنی بر کشت، فقط سلول‌های زنده را کشف و شمارش می‌کند (Josephson et al., 1993). DNA استخراج شده از دو باکتری سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوطه در شکل ۱ (A)، قابل مشاهده است. DNA استخراج شده از بافت عضله سینه مرغ، کبد و سنگدان با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی و از رنگ safe stain برای مشاهده DNA استفاده شد (شکل ۱، B).

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و روش جدیدتر real-time PCR برای کشف سالمونلا یا سروتیپ‌های ویژه در برخی از مواد غذایی، توسعه یافته‌اند (Ferretti et al., 2001). چندین روش PCR، بوسیله هدف قرار دادن ژن‌های مختلف سالمونلا، از قبیل 16S rRNA (Iida et al., 1993)، agfA (Doran et al., 1993)، و ویروالانس مربوط به پلاسمیدها توسعه یافته‌اند (Mahon, and Lax, 1993). به نظر می‌رسد که برای کشف گونه‌های سالمونلا، روش PCR، نسبت به روش‌های سنتی کشت، برتری دارد. درحالی‌که روش PCR، کشف سریع، حساس و ویژه پاتوژن



شکل ۱- (A) الکتروفورز ژل آگارز DNA استخراج شده از باکتری‌های *Salmonella typhimurium* و *Salmonella enteritidis*. ردیف M نشانگر وزنی DNA، ردیف ۱ باند DNA استخراج شده از باکتری *Salmonella typhimurium* و ردیف ۲ باند DNA استخراج شده از باکتری *Salmonella enteritidis* می‌باشد. (B): ردیف M نشانگر وزنی DNA، ردیف‌های ۱، ۲، ۳ باند DNA استخراج شده از بافت مرغ، ردیف‌های ۴ و ۵ باند DNA استخراج شده از بافت کبد و ردیف‌های ۶ و ۷ باند DNA استخراج شده از بافت سنگدان می‌باشد.

Fig. 1. (A) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* bacteria. Row M indicates DNA Marker, row 1 is the DNA band extracted from *Salmonella typhimurium* bacteria, and row 2 is the DNA band extracted from *Salmonella enteritidis* bacteria. (B): row M is the DNA weight marker, rows 1, 2, 3 are DNA bands extracted from chicken tissue, rows 4 and 5 are DNA bands extracted from liver tissue, and rows 6 and 7 are DNA bands extracted from bone tissue.

نتایج واکنش Real time PCR

شناسایی باکتری *Salmonella typhimurium* به کمک واکنش PCR

محصول PCR مربوط به ژن *siiA* باکتری *Salmonella typhimurium* با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از دستگاه Gel Documentation باند مورد نظر در محدوده ۱۰۷ bp رویت گردید. از تعداد ۹ نمونه که در تست Real time PCR مثبت تشخیص داده شده بود، تعداد ۷ نمونه آلوده به باکتری *Salmonella typhimurium* بوده و واجد ژن *siiA* می‌باشد که از این ۷ نمونه، ۵ مورد مربوط به بافت مرغ و ۲ مورد مربوط به کبد می‌باشد. از آنجایی که ژن *siiA* اختصاصی گونه *Salmonella typhimurium* می‌باشد (Ben Hassena et al., 2015). نتایج، تاییدی بر تشخیص گونه *Salmonella typhimurium* در این ۷ نمونه می‌باشد. محصول PCR ژن *siiA* دارای اندازه ۱۰۷ bp می‌باشد.

نتایج واکنش PCR جهت تشخیص باکتری *Salmonella enteritidis*

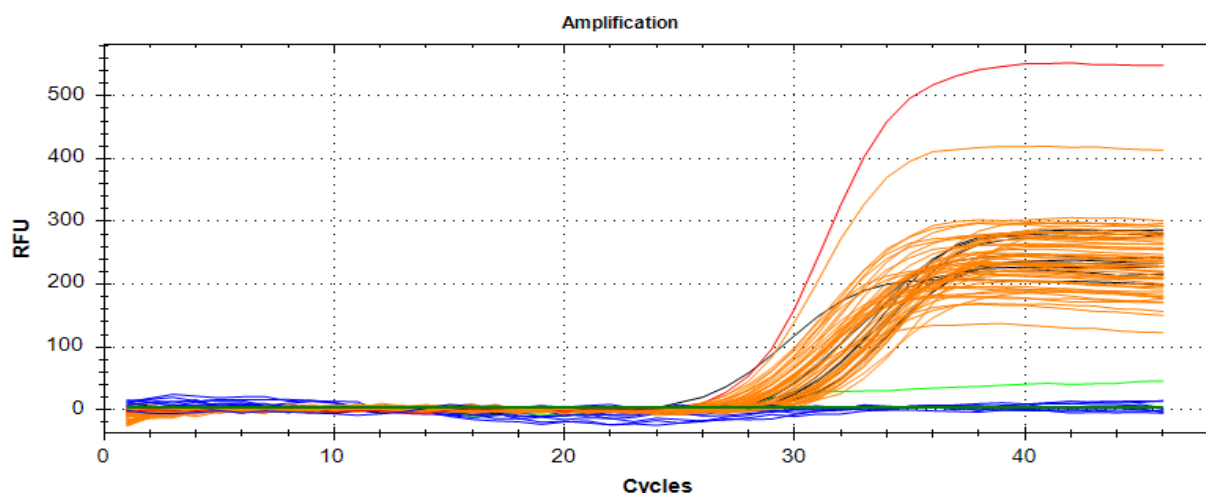
محصول PCR ناشی از تکثیر ژن IE1 بعد از بررسی با دستگاه Gel Documentation، باندی در محدوده ۳۱۶ bp تشکیل داد. از تعداد ۹ نمونه که در آزمون Real time PCR مثبت تشخیص داده شده بود، تعداد ۱ نمونه آلوده به باکتری *Salmonella enteritidis* بوده که

روش real-time PCR تشخیصی، برای کشف و شناسایی اختصاصی *Salmonella* در مواد غذایی، به‌عنوان یک ابزار سریع و موثق برای کنترل نمونه‌های آلوده شده در طول زنجیره تولید غذا، به‌طور فزاینده‌ای در حال استفاده است. برخی از روش‌های بر پایه real-time PCR برای شناسایی *Salmonella*، قبلاً مورد توصیف قرار گرفته‌اند (Chen et al., 1997; Hoorfar et al., 2000; Knutsson et al., 2002). اکثر این آزمون‌ها به‌عنوان یک ابزار تشخیصی قابل کاربرد نمی‌باشند که این امر به دلیل فقدان یک کنترل داخلی تکثیر (IAC) می‌باشد. یک روش PCR برای تشخیص *Salmonella*، در مطالعات همکاری بین المللی، ارزیابی و تعیین اعتبار شد (Malorny et al., 2003). این آزمون یک قطعه ۲۸۴ جفت بازی از ژن *invA* را تکثیر می‌کند و به دنبال آن الکتروفورز ژل آگارز صورت می‌گیرد.

از تعداد ۴۵ نمونه که ۱۵ نمونه شامل بافت مرغ، ۱۵ نمونه شامل بافت کبد و ۱۵ نمونه مربوط به بافت سنگدان می‌باشد، نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که مجموعاً ۹ نمونه آلوده به جنس *Salmonella* بودند (شکل ۲). از این ۹ نمونه، ۶ نمونه مربوط به بافت مرغ، ۲ نمونه مربوط به بافت کبد و ۱ نمونه مربوط به بافت سنگدان می‌باشد. این ۹ نمونه جهت تشخیص دو گونه *Salmonella typhimurium* و *Salmonella enteritidis* مورد PCR قرار گرفتند.

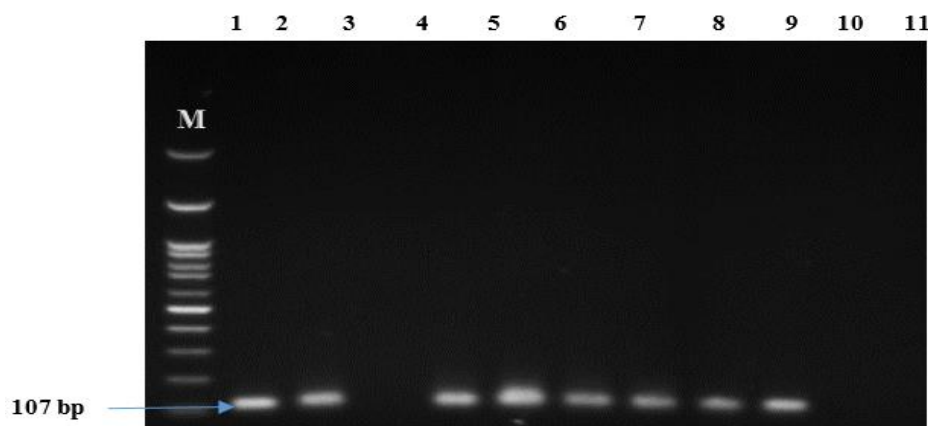
به منظور توسعه یک روش ویژه PCR برای کشف و شناسایی سالمونلا، استفاده شدند. ژن *stn* به طور وسیعی در گونه‌های جنس سالمونلا توزیع شده است. این ژن بر روی کروموزوم سالمونلا تایفی موریوم قرار گرفته است و حضور یک ژن *stn* سالم و دست نخورده، به طور قابل توجهی به خاصیت تهاجمی و ویرولانز سالمونلا، کمک می‌کند. این مطالب مبین و موید این است که علاوه بر ژن مورد استفاده در کار ما (*inv A*) ژن‌های دیگری هم استفاده شده است.

مربوط به بافت مرغ می‌باشد و تنها این ۱ نمونه واجد ژن IE1 می‌باشد. از آنجایی که ژن IE1 اختصاصی جنس سالمونلا می‌باشد (Paião et al., 2013)، نتایج، تاییدی بر تشخیص جنس سالمونلا/تتریتیدیس در این ۱ نمونه می‌باشد. محصول PCR ژن IE1 دارای اندازه ۳۱۶ bp می‌باشد. Riyaz-Ul- Hassan و همکاران (۲۰۰۴) روشی را برای کشف و شناسایی سریع سالمونلا به وسیله واکنش‌های زنجیره‌های پلی‌مرز پیشنهاد دادند. در این مطالعه، پرایمرها بر اساس ژن *stn*



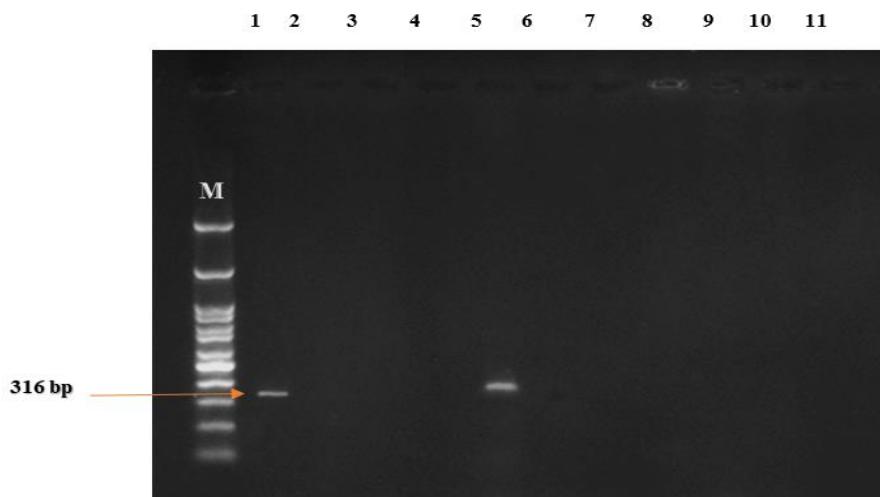
شکل ۲- منحنی تکثیر مربوط به کنترل منفی (سبز). کنترل مثبت (قرمز)، نمونه‌های دارای عدم آلودگی به سالمونلا (آبی)، نمونه‌های آلوده به سالمونلا (سیاه) و کنترل داخلی همه نمونه‌ها (نارنجی).

Fig. 2. Proliferation curve of the negative control (green). Positive control (red), Salmonella-free samples (blue), Salmonella-contaminated samples (black) and internal control of all samples (orange).



شکل ۳- شناسایی باکتری سالمونلا تیفی موریوم. ردیف M نشانگر وزنی DNA، (لدر ۱۰۰ bp بوده و شامل ۱۰ باند از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ می‌باشد). ردیف ۱، کنترل مثبت (سویه سالمونلا تیفی موریوم)، ردیف‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ نمونه‌های آلوده به باکتری سالمونلا تیفی موریوم می‌باشد. ردیف ۳ و ۱۰ نمونه‌های عاری از آلودگی می‌باشند و ردیف ۱۱، کنترل منفی.

Fig. 3. Identification of *Salmonella typhimurium* bacteria. Lane M is the DNA weight Marker (the ladder is 100 bp and includes 10 bands from 100 to 1000). Lane 1, positive control (*Salmonella typhimurium* strain), Lanes 9, 8, 7, 6, 5, 4, 2 Samples are contaminated with *Salmonella typhimurium* bacteria. Lanes 3 and 10 are contamination-free samples, and Lane 11 is the negative control.



شکل ۴- شناسایی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس*. ردیف M نشانگر وزنی DNA (لدر ۱۰۰ bp بوده و از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ می باشد)، ردیف ۱، کنترل مثبت (سویه *سالمونلا انتریتیدیس*)، ردیف ۵ نمونه آلوده به باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* می باشد. ردیف های ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ نمونه های عاری از آلودگی می باشند و ردیف ۱۱، کنترل منفی.

Fig. 4. Identification of *Salmonella enteritidis* bacteria. Lane M is the weight Marker of DNA (the ladder is 100 bp and ranges from 100 to 1000), Lane 1 is the positive control (*Salmonella enteritidis* strain), Lane 5 is the sample contaminated with *Salmonella enteritidis* bacteria. Lanes 10, 9, 8, 7, 6, 4, 3, 2 are contamination-free samples and Lane 11 is the negative control.

داده شده بود، تعداد ۷ نمونه آلوده به باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم بوده و واجد ژن *siiA* می باشد، که از این ۷ نمونه، ۵ مورد مربوط به بافت مرغ و ۲ مورد مربوط به کبد، و یک مورد از نمونه های آلوده مربوط به ژن IE1 در *سالمونلا انتریتیدیس* می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، شناسایی بیان ژن های مذکور در بافت های سینه، کبد و سنگدان نشان دهنده این مطلب است که روش PCR و real time PCR می تواند به عنوان ابزاری مناسب در شناسایی این پاتوژن در بافت های مورد نظر مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات اخیر نیز نشان دهنده این مطلب هستند که ترکیب تکنیک های PCR و تکنیک های مبتنی بر فلورسنس همچون real time PCR (qPCR) جهت شناسایی پاتوژن های غذایی ابزارهای بسیار مناسبی هستند (Rodríguez-Lázaro et al., 2013). بی تردید یکی از دقیق ترین، حساس ترین و سریع ترین تکنیک های تشخیصی عوامل پاتوژن روش های مولکولی است (Benet et al., 1998). یکی از رایج ترین روش های تشخیصی مولکولی واکنش های زنجیره ای پلی مرز (PCR) است (Davis et al., 1998). این روش دارای بیشترین دقت، حساسیت و اختصاصی بودن و نیز سرعت می باشد چراکه اساس آن تشخیص DNA (قسمتی از ژن) است (D'Aoust and Purvis, 1998). با استفاده از این روش می توان چند ژن مورد نظر را در یک جنس و یا سویه باکتری تشخیص داد، علاوه بر آن می توان، همزمان چندگونه باکتری را تشخیص داد (Soradeghi et al., 2021). اساس این تکنیک تکثیر قسمتی از DNA با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی است. مزیت دیگر این

با توجه به اینکه جنس *سالمونلا* به عنوان یک پاتوژن غذایی و عامل بیماری های گوارشی همچون تب تیفوئید یا حصبه، منجر به کاهش کیفیت محصولات غذایی از طریق ایجاد آلودگی مواد غذایی می شود. از این رو، شناسایی روش های سریع و کارآمد در شناسایی این جنس بسیار ضروری است. بنابراین، این تحقیق با هدف معرفی و تایید روش های PCR و real time PCR در شناسایی دو گونه بیماری زای *سالمونلا* شامل *سالمونلا تیفی* موریوم و *سالمونلا انتریتیدیس* در بافت حیوانی مرغ، کبد مرغ و سنگدان مرغ می باشد. با توجه به اینکه هر یک از باکتری های مذکور دارای یک ژن مارکر شامل ژن IE1 در *سالمونلا انتریتیدیس* (Paião et al., 2013) و ژن *siiA* در باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم (Ben Hassena et al., 2015) می باشند. در این تکنیک ها از ژن های مذکور به عنوان نشانگر مولکولی استفاده گردید و از دو جفت پرایمر (*siiA* Fw، *siiA* Rv؛ IE1 Fw، IE1 Rv) برای دو ژن، IE1 (Paião et al., 2013) و *siiA* (Ben Hassena et al., 2015) استفاده شد. قسمتی از ژن که توسط این پرایمرها تکثیر می شود، به ترتیب ۳۱۶ و ۱۰۷ bp طول دارد. ژن IE1 جهت تشخیص جنس *سالمونلا انتریتیدیس* (Paião et al., 2013) و ژن *siiA* جهت تشخیص گونه *سالمونلا تیفی* موریوم (Ben Hassena et al., 2015) مورد استفاده قرار می گیرد. از آن جایی که انتخاب قطعه ژن و پرایمر مناسب و درجه حرارت مطلوب در مرحله annealing از پارامترهای موثر در سیکل تکثیری PCR است، لذا این دو ژن انتخاب گردیدند. بر اساس نتایج از تعداد ۹ نمونه که در تست Real time PCR مثبت تشخیص

تحقیق امکان تشخیص سریع و هم زمان باکتری فوق‌العاده بیماری‌زای منتقل شده از طریق مواد غذایی یعنی سالمونلا، با اختصاصیت و حساسیت بالا در سالمونلا و از مرغ بهینه‌سازی شد. نتایج حاصل از Real time PCR از مجموع ۴۵ نمونه، ۹ نمونه آلوده به جنس سالمونلا نشان داد. نتایج روش PCR معمولی نشان داد از تعداد ۹ نمونه مثبت در تست Real time PCR، بیشترین آلودگی به گونه سالمونلا تیفی موریوم بوده (۷ مورد از ۹ مورد) که از این ۷ نمونه، بیشترین آلودگی مربوط به سینه مرغ (۵ مورد) و ۲ مورد مربوط به کبد بودند. آلودگی به باکتری سالمونلا/انتریتیدیس از تعداد ۹ نمونه، تنها یک نمونه آلوده بود که مربوط به سینه مرغ می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد و با گرنت شماره ۳/۴۶۵۸۷/انجام پذیرفت.

تکنیک عدم وابستگی PCR به بیان ژن است، زیرا در روش‌های بیوشیمیایی تغییرات فیزیکی ناشی از فعالیت‌های متابولیکی عامل پاتوژن موجب می‌شود به وجود آنتی‌ژن و یا عامل بیماری‌زا پی برد و عدم تولید آنتی‌ژن در این روش دلالت بر عدم وجود عامل بیماری‌زا می‌کند، در صورتی که ممکن است عامل بیمارزا هنوز آنتی‌ژن تولید نکرده باشد (D'Aoust and Purvis, 1998). ژن‌های هدف متعددی جهت شناسایی برای سویه‌های سالمونلا معرفی گردیده است: RfbE, FliC, InvA, SpvC, Int, Flo (Cowden et al., 1989) تمامی این ژن‌ها را می‌توان با Nested PCR، Semi nested PCR و Multiplex PCR و سایر روش‌های PCR تکثیر کرد (Cowden et al., 1989).

نتیجه‌گیری

روش real-time PCR به‌عنوان یک روش سریع با امکان تشخیص هم زمان چندین عامل بیماری‌زا هم در زمینه‌های پزشکی و هم صنایع غذایی بسیار مورد توجه و استفاده قرار گرفته است. در این

منابع

- Alcamo, E. (1997): Fundamentals of microbiology. 5th edit. P: 235-238.
- Andrews W. H and Hammack, T. S. "Chapter 5: Salmonella," in (Food and Drug Administration) Bacteriological Analytical Manual Online, (2003), <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>.
- Apfalter, P., Barousch, W., Nehr, M., Makristathis, A., Willinger, B., Rotter, M., & Hirschl, A. M. (2003). Comparison of a new quantitative ompA-based real-time PCR TaqMan assay for detection of Chlamydia pneumoniae DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 592-600. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.592-600.2003>
- Azizpour, A., Judri, S. (2018), investigating the prevalence of Salmonella serotypes in animal feed and their drug resistance to common antibiotics in medical centers. Comparative pathobiology, scientific research, year 16, spring, number 1, pp. 2758-2751. (In Persian)
- Bejai Al-Zhaibi, A., Yahya Raiit, R., Neyri Fasai, B., Qalanchi Langroudi, A., Zahrai Salehi, T., (2018), identification and differentiation of serovars of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pleurum*, *Salmonella gallinarum* and *Salmonella* Dublin using Genome-specific multiplexing test. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. Volume 13, pp. 131-142. (In Persian)
- Ben Hassena, A., Barkallah, M., Fendri, I., Grosset, N., Ben Neila, I., Gautier, M., Gdour, R. (2015). Real time PCR gene profiling and detection of Salmonella using a novel target: The *siiA* gene. *Journal of Microbiological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.018>
- Bennet, A. R., Greengood, D., Tannant, C., Banks, J. G., Betts, R. R. (1998). Rapid and definitive detection of salmonella in foods By PCR. *Lett. Appl. microbial*. 26 .437.441. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00368.x>
- Borges, K. A., Martelo, E. B., Dos Santos, L. A., Furian, T. Q., Cisco, I. C., Manto, L., & Dos Santos, L. R. (2019). Detection and quantification of Salmonella spp. in poultry slaughterhouses of southern Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(05), 455-460.
- Boyd, E. F., Li, J., Ochman, H., & Selander, R. K. (1997). Comparative genetics of the inv-spa invasion gene complex of Salmonella enterica. *Journal of Bacteriology*, 179, 1985–1991. <https://doi.org/10.1128/jb.179.6.1985-1991.1997>
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J. C., Stein, R. E., & Ge, B. (2011). Rapid detection of viable Salmonellae in produce by coupling *propidium monoazide* with loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4008–4016. <https://doi.org/10.1128/AEM.00354-11>
- Chen, S., Yee, A., Griffiths, M., Larkin, C., Yamashiro, C. T., Behari, R., .. & Stephanie, A. (1997). The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of Salmonella species in food commodities. *International journal of food microbiology*, 35(3), 239-250.

12. Cheng, C. M., Lin, W., Van, K. T., Phan, L., Tran, N. N., & Farmer, D. (2008). Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. *Journal of food protection*, 71(12), 2436-2441.
13. Cowden, J. M., O'mahony, M., Bartlett, C. L. R., Rana, B., Smyth, B., Lynch, D., ... & Kilsby, D. C. (1989). A national outbreak of *Salmonella typhimurium* DT 124 caused by contaminated salami sticks. *Epidemiology & Infection*, 103(2), 219-225. <https://doi.org/10.1017/S0950268800030569>
14. D'Aoust, J.Y and Purvis, U. (1998). Isolation an identification of salmonella from foods. MFHPB-20. Health Protection Branch, Health Canada, Ottawa, Canada. p:145-230.
15. Davis, R. H., Nicholas, R. A., McLaren, L. M., Corkish, J. D., Laning, D. G., Wary, C. (1998). Bacteriological and serological investigation of persistent *Salmonella enteritidis* infection in an integrated poultry organization. *Vet. Microb.* 58(2-4):277-293. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00157-0)
16. Doran, J. L., Collinson, S. K., Burian, J., Sarlos, G., Todd, E. C., Munro, C. K., ... & Kay, W. W. (1993). DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *Journal of clinical microbiology*, 31(9), 2263-2273. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.9.2263-2273.1993>
17. EC, C. R. (2005). Microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 338, 1-29.
18. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and, & Control). (2015). Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne. *EFSA Journal*, 13(1), 162.
19. Ferretti, R., Mannazzu, I., Cocolin, L., Comi, G., & Clementi, F. (2001). Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 977-978. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.977-978.2001>
20. Galán, J. E., & Curtiss 3rd, R. (1991). Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and immunity*, 59(9), 2901-2908. <https://doi.org/10.1128/iai.59.9.2901-2908.1991>.
21. Hashimoto, Y., Itho, Y., Fujinaga, Y., Khan, A. Q., Sultana, F., Miyake, M., ... & Ezaki, T. (1995). Development of nested PCR based on the *ViaB* sequence to detect *Salmonella typhi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), 775-777. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.775-777.1995>.
22. Hoorfar, J., Ahrens, P., & Rådstrom, P. (2000). Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of clinical microbiology*, 38(9), 3429-3435.
23. Iida, K., Abe, A., Matsui, H., Danbara, H., Wakayama, S., & Kawahara, K. (1993). Rapid and sensitive method for detection of *Salmonella* strains using a combination of polymerase chain reaction and reverse dot-blot hybridization. *FEMS microbiology letters*, 114(2), 167-172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06568.x>.
24. Josephson, K. L., Gerba, C. P., & Pepper, I. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), 3513-3515. <https://doi.org/10.1128/aem.59.10.3513-3515.1993>
25. Knutsson, R., Löfström, C., Grage, H., Hoorfar, J., & Rådstrom, P. (2002). Modeling of 5' nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 52-60. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.52-60.2002>
26. Kurowski, P. B., Traub-Dargatz, J. L., Morley, P. S., & Gentry-Weeks, C. R. (2002). Detection of *Salmonella* spp in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay. *American journal of veterinary research*, 63(9), 1265-1268.
27. Le Minor, L. (1981). The Genus salmonella, In M.P.Stolp(ed), The Prokaryotes Springer-Verlag, New York, N. Y. P:1148-1156.
28. Liljebjelke, K. A., Hofacre, C. L., Liu, T., White, D. G., Ayers, S., Young, S., & Maurer, J. J. (2005). Vertical and horizontal transmission of *Salmonella* within integrated broiler production system. *Food borne Pathogens & Disease*, 2(1), 90-102. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.90>
29. Mahon, J., & Lax, A. J. (1993). A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of salmonellas carrying the *spvR* gene. *Epidemiology & Infection*, 111(3), 455-464. <https://doi.org/10.1017/S0950268800057186>.
30. Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., & Helmuth, R. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 290-296. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.290-296.2003>
31. Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., ... & Helmuth, R. (2003). Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International journal of food microbiology*, 89(2-3), 241-249. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00154-5).
32. Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., & Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 7046-7052. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7046-7052.2004>

33. McGuinness, S., Barry, T., & O'Grady, J. (2010). Development and preliminary validation of a real-time RT-PCR based method targeting tmRNA for the rapid and specific detection of Salmonella. *Food Research International*, [doi:10.1016/j.foodres.2010.08.012](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.08.012).
34. Moghadam, A., Nazarian, Sh., Amani, J. 2017. Identification and investigation of *Salmonella Typhimurium*, Infantis and Enteritidis serotypes in clinical samples from medical centers in Kerman province. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 11(2), pp. 1-8. (In Persian).
35. Momtaz H, Ghaedamini M, Momeni M. Detection of virulence factors in *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* serotypes isolated from chicken meat in Chaharmahal va Bakhtiari Province of Iran. *J food Microbiol*. 2014; 1(1): 17-22.
36. Monadi, M., Kargar, M., Naghiha, A., and Mohammadi, R. 2012. Determining *Salmonella* contamination of native eggs in Kohgiluyeh and Boyer Ahmad provinces using PCR technique and evaluating drug resistance. *Armaghane Danesh*, 19(2), pp. 179-187. (In Persian).
37. Morsali, H., Asaadi, H., Yazdanesad, S., & Najafpour, R. (2017). Optimization of a Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Foodborne Pathogens *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 and Contamination Prevalence Assay in Meat Products. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 20(6), 83-93.
38. Mortazavi, A., Kashani-nejad, M., Zia-ul-Haq, S. H. 1993. *Food Microbiology*. pp. 184 to 185. (In Persian).
39. Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. J. C. C. A. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
40. Paião F.G, Arisitides I L.G.A, Muratel L.S, Vilas-Bôas II G.T, Vilas-Boas II L.A., Shimokomaki I M. 2013. Detection of *Salmonella* spp, *Salmonella Enteritidis* and *Typhimurium* in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000002>
41. Rad, M; Kalidri, Gh; Kurdjezi, Sh. Identification of different species of *Salmonella* in the center of domestic chicken breeding. *Research and construction*. 2008, period 21, number 4. pp. 87 to 93. (In Persian)
42. Riyaz-Ul-Hassan, S., Verma, V., & Qazi, G. N. (2004). Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes*, 18(5), 333-339. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.05.003>
43. Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., & Hernández, M. (2013). Real-time PCR in food science: PCR diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*, 15(2), 39-44. <https://doi.org/10.21775/cimb.015.039>
44. Sachse, K. 2003. Specificity and performance of diagnostic PCR assays. *Methods Mol. Biol.* 216:3-29. <https://doi.org/10.1385/1-59259-344-5:03>
45. Saroj. SD, Shashidhar. R, Karani. M, Bandekar. JR, Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture - nested PCR combination assay. *Mol Cell Probes*. 2008; 22(3): 201-6. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.02.002>
46. Siala, M., Barbana, A., Smaoui, S., Hachicha, S., Marouane, C., Kammoun, S., ... & Messadi-Akrout, F. (2017). Screening and detecting *Salmonella* in different food matrices in Southern Tunisia using a combined enrichment/real-time PCR method: correlation with conventional culture method. *Frontiers in microbiology*, 8, 2416. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02416>
47. Soradeghi Topkanlou, A., Shahidi, F., Javadmanesh, A., Mortazavi, A., Veridi, M., J., Roshank, S. 2021. Isolation and identification of microbial agents causing yellow spot in chicken sausage by culture and molecular methods. *Iranian journal of food science and industry*. 18 (114): pp. 1 to 14. (In Persian)
48. Vichaibun, V., & Kanchanaphum, P. (2020). Quantitative LAMP and PCR Detection of *Salmonella* in Chicken Samples Collected from Local Markets around Pathum Thani Province, Thailand. *International journal of food science*, 8833173. <https://doi.org/10.1155/2020/8833173>
49. Whyte P, Mc Gill K, Collins JD, Gormley E. (2002). The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet Microbiol*. 2;89(1):53-60. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00160-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00160-8)
50. Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F., & Li, B. (2016). Advances and Challenges in Viability Detection of Foodborne Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 7, 1833. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01833>



Determination of chemical composition and evaluation the antimicrobial activity of *Olea europaea* leaf extract against pathogenic bacteria “*in vitro*”

Behrooz Alizadeh Behbahani^{*1}, Mohammad Noshad², Mostafa Rahmati-Joneidabad³

Received: 2021.12.13

Revised: 2022.01.28

Accepted: 2022.02.07

Available Online: 2022.02.07

How to cite this article:

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. Rahmati-Joneidabad, M. (2022). Determination of chemical composition and evaluation the antimicrobial activity of *Olea europaea* leaf extract against pathogenic bacteria “*in vitro*”. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 603-614.

Abstract

Introduction: Oxidation and food pathogens are considered two important and influential factors affecting food quality and health. Recently, due to the increasing demand for natural products, the application of synthetic preservatives to control microbial growth and lipid oxidation have been decreased significantly. Therefore, natural antioxidant and antimicrobial compounds are receiving more attention in food preservation technologies. In the last 2 decades, the use of herbal medicines rich in bioactive molecules (including polyphenols, carotenoids and flavonoids) with medicinal and health effects such as delaying the onset of some diseases such as cardiovascular disorders, diabetes, and cancer have increased. Furthermore, secondary metabolites in plant extracts and essential oils are able to control and inhibit free radical-mediated reactions. The olive tree (*Olea europaea*) is an evergreen plant that grows in tropical and subtropical regions. Iran is one of the most important olive growers in the world due to its suitable conditions for olive cultivation. The leaves of the olive plant have a high potential for the production of various products such as tea and extracts. Olive leaf extract can be used as a raw material in the production of various products, due to exhibiting various biological activities such as antimicrobial and antiviral activity, lipid stabilizer, blood pressure regulator, antioxidant activity, and free radical scavenger. The leaves of the olive tree also contain various phenolic compounds, mainly Oleuropein and hydroxytyrosol, with antioxidant and antimicrobial activities. Therefore, in this study, the amount of phenolic and flavonoid compounds of olive leaf ethanolic extract and its antioxidant effect and antimicrobial properties on *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus* and *Listeria innocua* were investigated.

Materials and Methods: The olive leaf ethanolic extract was prepared through maceration method and its total phenolic content (Folin-Ciocalteu method), total flavonoids content (aluminum chloride colorimetric assay), antioxidant activity (ABTS and DPPH free radical scavenging methods), and antimicrobial effect on *E. coli*, *E. aerogenes*, *B. cereus* and *L. innocua* (based on disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration) were determined according to standard methods. Data were analyzed by SPSS software through one-way ANOVA and Duncan test at $p < 0.05$.

Results and Discussion: The ethanolic extract of olive leaves contained 176.58 ± 0.72 mg GAE/g total phenol and 69.85 ± 0.26 mg QE/g total flavonoids. In addition, ethanolic extract of olive leaf was able to inhibit free radicals DPPH ($70.62 \pm 0.59\%$) and ABTS ($76.15 \pm 0.43\%$). The antimicrobial results showed that the antimicrobial effect of the extract depended on its concentration and type of bacteria. Antimicrobial effect was increased as a function of ethanolic extract,

1. 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.

2. 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.

3. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

(*Corresponding Author Email: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir)

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.74472.1130](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74472.1130)

and Gram-positive bacteria (*B. cereus* and *L. innocua*) were more sensitive to ethanolic extract of olive leaf than Gram-negative bacteria (*E. aerogenes* and *E. coli*). Generally, *B. cereus* and *E. aerogenes* were the most sensitive and resistant microbial strains to ethanolic extract of olive leaf, respectively.

The results of this study showed that the high antioxidant and antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract is mainly due to its phenolic and flavonoid compounds. Olive leaf ethanolic extract was able to neutralize DPPH and ABTS free radicals. Also, Gram-positive bacteria were more sensitive to ethanolic extract of olive leaf than Gram-negative bacteria. In general, the ethanolic extract of olive leaf can be used as a nutraceutical to control or prevent the growth of spoilage/infection-causing microorganisms and free radical reactions in food and the human body. However, more in-depth studies are needed to determine the mechanism of antimicrobial and antioxidant effects of olive ethanolic extract *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Olive leaf; Ethanolic extract; Antimicrobe; Antioxidant; Natural preservative.

مقاله علمی-پژوهشی

تعیین ویژگی‌های شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی عصاره برگ زیتون بر باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی

بهروز عزیزاده بهبهانی^{۱*} - محمد نوشاد^۲ - مصطفی رحمتی جنیدآباد^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

چکیده

این مطالعه پژوهشی با هدف استخراج عصاره اتانولی برگ زیتون (*Olea europaea*) و بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن صورت گرفت. عصاره اتانولی برگ زیتون با کمک روش خیساندن تهیه شد و محتوای فنول و فلاونوئید کل بر اساس روش‌های رنگ‌سنجی معرف فولین-سیوکالتو و کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری گردید. پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره با روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS ارزیابی شد. علاوه بر این، فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون در برابر باکتری‌های بیماری‌زا (*شرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا اینوکوا*) بر پایه روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید. عصاره اتانولی برگ زیتون حاوی $0.72 \pm 176/58$ mg GAE/g فنول کل و $0.26 \pm 69/85$ mg QE/g فلاونوئید کل بود. علاوه بر این، عصاره اتانولی برگ زیتون قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ($0.59 \pm 70/62$ درصد) و ABTS ($0.43 \pm 76/15$ درصد) بود. نتایج ضد میکروبی نشان داد اثر ضد میکروبی عصاره وابسته به غلظت آن و نوع باکتری است و باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *انتروباکتر ائروژنز* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های میکروبی در برابر عصاره اتانولی برگ زیتون بودند. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی برگ زیتون را می‌توان به‌عنوان ترکیب زیست فعال طبیعی با ویژگی‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالا معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: برگ زیتون، عصاره اتانولی، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان، نگهدارنده طبیعی.

مقدمه

(et al., 2020). در دو دهه اخیر، استفاده از داروهای گیاهی به‌عنوان ترکیبات غنی از مولکول‌های زیست فعال (از جمله پلی‌فنول‌ها، کارتنوئیدها و فلاونوئیدها) و با اثرات دارویی و سلامتی‌بخش مانند تأخیر در شروع برخی از بیماری‌ها مانند اختلالات قلبی عروقی، دیابت و سرطان افزایش یافته است (Alizadeh Behbahani et al., 2020). همچنین متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی قادر به کنترل و مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشند (Tabatabaei Yazdi et al., 2018).

درخت زیتون با نام علمی *Olea europaea* از تیره Oleaceae گیاهی همیشه سبز با ارتفاع حدود ۵ متر بوده که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند (Najafian et al., 2007; Abbas et al., 2007).

با وجود پیشرفت‌های جدید در صنایع غذایی، امروزه بهداشت و ایمنی مواد غذایی از جمله مسائل مورد توجه مصرف‌کنندگان، تولیدکنندگان و سازمان‌های نظارتی می‌باشد (Barzegar et al., 2017). اکسیداسیون و پاتوژن‌های غذایی دو فاکتور مهم و تأثیرگذار در کیفیت و سلامت مواد غذایی به شمار می‌آیند (Barzegar et al., 2020). اخیراً، به دلیل افزایش تمایل به محصولات طبیعی، استفاده از نگهدارنده‌های مصنوعی جهت کنترل رشد میکروبی و اکسیداسیون لیپیدها به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. بنابراین، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی طبیعی بیش از پیش مورد توجه تحقیقات و صنعتی در فناوری‌های نگهداری مواد غذایی قرار می‌گیرند (Kiasi et al., 2020).

۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

* نویسنده مسئول: Email: B.alizadeh@asnruk.ac.ir

DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74472.1130

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

محیط در سایه خشک گردید. پس از آسیاب، ۵۰ g از برگ‌های پودر شده به ۲۵۰ mL اتانول اضافه و ۷۲ h در انکوباتور شیکردار همزده شد. همزدن با سرعت ثابت انجام شد تا حلال به‌طور مؤثر و کامل با ترکیبات موجود در پودر برهمکنش دهد و درصد ترکیبات در عصاره تولیدی بالا رود. پس از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی واتمن، شفاف‌سازی با استفاده از سانتریفوژ در سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min انجام شد. استریل نمونه با اشعه UV و حذف حلال با استفاده از اواپراتور تحت خلأ صورت گرفت. عصاره تهیه شده در ظروف دارای فویل آلومینیومی و دور از نور و در دمای ۴°C در یخچال نگهداری شد (Tabatabaei Yazdi et al., 2016).

تعیین فنول کل

روش فولین-سیوکالچو به‌منظور تعیین فنول کل مورد استفاده گرفت. در این آزمون، ۲۰ µL عصاره به ۱۰۰ µL معرف فولین-سیوکالچو و ۲ mL آب اضافه شد. محلول به مدت ۳ min نگهداری و سپس ۳۰۰ µL محلول سدیم کربنات به آن اضافه گردید. پس از هم زدن محلول به مدت ۲ h جذب آن در طول موج ۷۶۵ nm اندازه‌گیری شد. از گالیک اسید جهت تهیه نمودار استاندارد استفاده شد. مقدار فنول کل بر اساس میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک عصاره (mg GAE/g) گزارش گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

در این روش ۱ mL عصاره با ۱/۲۵ mL آب مقطر مخلوط گردید. سپس ۷۵ µL نیتريت سدیم (۵ درصد) به آن اضافه شد. پس از گذشت ۵ min، ۱۵۰ µL آلومینیوم تری کلرید (۱۰ درصد) به آن اضافه گردید. سپس ۱ mL سود به آن اضافه شد. پس از ۵ min جذب نمونه در طول موج ۵۱۰ nm اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندارد با استفاده از محلول کوثرستین رسم گردید و از آب مقطر به‌عنوان شاهد استفاده شد (Sosani Gharibvand et al., 2020).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

در این روش ۱ mL عصاره با ۱ mL محلول DPPH (۰/۲ mM) در اتانول مخلوط گردید. پس از ۳۰ min در دمای اتاق جذب آن در طول موج ۵۱۷ nm اندازه‌گیری شد. به جای عصاره از آب مقطر جهت

(Vali et al., 2015). ایران به دلیل دارا بودن شرایط مناسب برای کشت زیتون، از مهم‌ترین تولیدکنندگان زیتون در جهان به‌شمار می‌آید. برگ گیاه زیتون پتانسیل بالایی برای تولید محصولات گوناگونی مانند چای و عصاره می‌باشد. عصاره برگ گیاه زیتون به دلیل فعالیت بیولوژیکی مختلف مانند فعالیت ضد میکروبی و ضد ویروس، پایدارکننده لیپید، تنظیم‌کننده فشارخون و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد می‌تواند به‌عنوان یک ماده خام در تولید محصولات مختلف مورد استفاده قرار گیرد. همچنین برگ‌های درخت زیتون حاوی ترکیبات فنولی مختلف می‌باشد. از جمله بیشترین ترکیبات فنولی موجود در برگ درخت زیتون می‌توان به ال‌توروپین و هیدروکسی تیروزول اشاره کرد (Mallakian et al., 2019). ال‌توروپین و سایر ترکیبات فنولی موجود در عصاره برگ زیتون مانند اسید فرولیک، اسید پاراهیدروکسی بنزوئیک، کوثرستین، تیروزول و غیره دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند (Abbas Vali et al., 2015). فعالیت ضد میکروبی چهار رقم زیتون بومی ایران بر باکتری/شرشیا کلی گزارش شده است (Abbas Vali et al., 2015). همچنین Abbas Vali و همکاران (۲۰۱۵) اثر ضد میکروبی عصاره برگ چهار رقم زیتون بر باکتری باسیلوس سرئوس را گزارش کردند (Abbas Vali et al., 2015). علاوه بر این، Aghajani و Khabarizadeh (۲۰۱۵) خاصیت آنتی‌اکسیدانی برگ ۲ رقم زیتون (کنسرولیا و میشین) به روش مهار رادیکال آزاد DPPH را بررسی کردند. در این پژوهش میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی برگ گیاه زیتون و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله/شرشیا کلی، انتروباکتر ائروژنز، باسیلوس سرئوس و لیستریا/اینوکوا بررسی شد (Aghajani and Khabarizadeh, 2015).

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل محیط‌های کشت مولر هیتتون براث^۱، مولر هیتتون آگار^۲ و ۲-۳-۵ تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید^۴ (مرک، آلمان)، رادیکال آزاد ABTS^۵، رادیکال آزاد DPPH، معرف فولین-سیوکالچو^۶ (سیگما، آمریکا) بودند.

تهیه عصاره اتانولی برگ گیاه زیتون

از روش خیساندن به‌منظور تهیه عصاره اتانولی برگ گیاه زیتون استفاده شد. بدین ترتیب که، ابتدا برگ‌های گیاه به مدت ۷۲ h در دمای

5 (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

6 Folin-Ciocalteu reagent

1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

2 Mueller hinton broth

3 Mueller hinton agar

4 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride

حداقل غلظت مهارکنندگی

پس از تهیه غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ گیاه زیتون (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1000 µL) از هر یک از رقت‌های استریل شده به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. سپس ۱۰ µL از سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک‌فارلند) به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C، ۱۰ µL معرف تری فنل تترازولیوم (5 mg/mL) اضافه گردید. کمترین غلظتی از عصاره که مانع از رشد باکتری شده و هیچگونه تغییر رنگی در آن مشاهده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2020).

حداقل غلظت کشندگی

به‌طور خلاصه در این روش، ۱۰۰ µL از چاهک‌های فاقد رنگ قرمز (در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی) در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ h در دمای ۳۷ °C، اولین غلظت فاقد هیچگونه رشد روی محیط مولر هیتتون آگار به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (Shahidi, 2019).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) انجام شد.

نتایج و بحث

فنول و فلاونوئید کل

گیاهان دارویی دارای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مختلفی می‌باشند. پلی‌فنول‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشند که سبب جذب رادیکال‌های آزاد و خنثی‌سازی آن‌ها می‌شوند. این ترکیبات در محافظت از بدن در برابر استرس اکسیداتیو و سرطان‌های پرستات سینه، روده بزرگ و پوست نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Noktehsanj, 2018). محتوای فنول کل و فلاونوئید کل عصاره اتانولی برگ زیتون در شکل ۱، آورده شده است. عصاره اتانولی حاوی ۶۹/۸۵ ± ۰/۲۶ mg QE/g و ۱۷۶/۵۸ ± ۰/۷۲ mg GAE/g فنول کل و فلاونوئید کل بود. ال‌توروپین به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب فنولی برگ زیتون شناخته می‌شود و سایر ترکیبات فنولی از قبیل فرولیک اسید، وانیلیک اسید، پاراهیدروکسی بنزوئیک، سینرژیک اسید، پروکاتکولیک، پاراکوماریک اسید، تیروزول، کولرستین، التولیک اسید و هیدروکسی تیروزول در برگ زیتون شناسایی شده‌اند که دارای فعالیت ضد میکروبی

تهیه نمونه کنترل استفاده شد. قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2020):

$$(1) \quad (\%) \text{ DPPH-RS} = (1 - A_{\text{نمونه}} / A_{\text{کنترل}}) \times 100$$

روش مهار رادیکال آزاد ABTS

مقادیر یکسانی از ABTS (۷ mM) و پتاسیم پرسولفات (mM) (۲/۴۵) جهت تولید رادیکال‌های آزاد ABTS با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱۶ h در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند. از متانول جهت رقیق‌سازی رادیکال‌های کاتیونی ABTS تولید شده تا رسیدن به جذب 0.07 ± 0.02 در طول موج ۷۳۴ nm استفاده گردید. سپس ۳/۹ mL محلول کاتیونی رادیکال ABTS با ۰/۱ mL عصاره (جذب نمونه) یا متانول (جذب کنترل) مخلوط و جذب آن‌ها در ۷۳۴ nm ثبت گردید. مهار رادیکال آزاد ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Barzegar et al., 2020):

$$(2) \quad (\%) \text{ ABTS-RS} = (1 - A_{\text{نمونه}} / A_{\text{کنترل}}) \times 100$$

تعیین خاصیت ضد میکروبی

دیسک دیفیوژن آگار

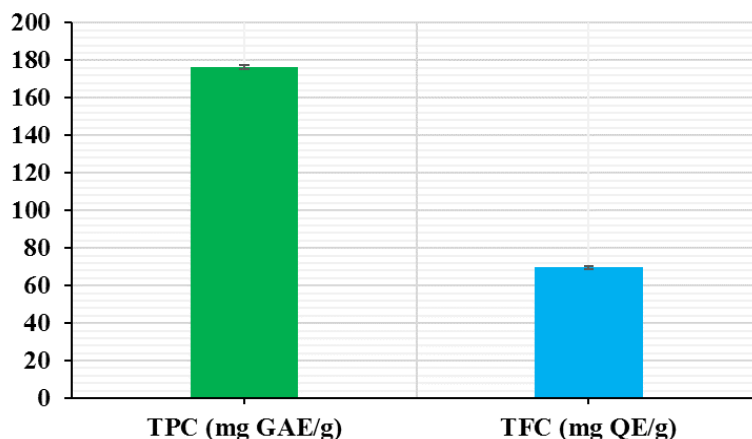
پس از استریل غلظت‌های مختلف عصاره (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰) با استفاده از فیلترهای ۲۲ میکرومتری، دیسک‌های بلانک به مدت ۱۵ min در غلظت‌های مختلف عصاره نگهداری شدند. در مرحله بعد سوسپانسیون‌های میکروبی مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند (طول موج ۶۲۵ نانومتری جذبی برابر با ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ دارد) روی محیط‌های کشت مولر هیتتون آگار کشت داده شدند و دیسک‌ها روی محیط تثبیت شدند. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C قطر هاله‌های عدم رشد اطراف هر یک از دیسک‌ها اندازه‌گیری گردید (Noshad et al., 2018).

چاهک آگار

به‌طور خلاصه، پس از ایجاد چاهک‌هایی با قطر ۶ mm و کشت سطحی باکتری‌ها روی محیط‌های مولر هیتتون آگار از هر یک از غلظت‌های تهیه شده در چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C شدند و قطر هاله‌های عدم رشد اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد (Alizadeh Behbahani et al., 2021).

ترتیب ۶۰/۹ و ۵۵/۷ mg GAE/g گزارش نمودند (Kiritsakis et al., 2010). علاوه بر این، Lins و همکاران (۲۰۱۸) بیان داشتند که عصاره متانولی برگ زیتون حاوی ۱۳۱/۷ mg GAE/g فنول کل و ۱۹/۴ mg QE/g فلاونوئید کل می‌باشد (Lins et al., 2018). نتایج این مطالعه با گزارش‌های سایر محققین مطابقت دارد؛ با این حال، تفاوت‌های جزئی در میزان ترکیبات پلی فنولی در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط استخراج، نوع حلال، واریته گیاه و شرایط کشت، داشت و برداشت باشد (Alizadeh Behbahani et al., 2018; Falah et al., 2021).

و آنتی‌اکسیدانی بالقوه‌ای می‌باشند (Del Río et al., 2003; Majeed and Jafarian, 2019). همکاران (۲۰۱۴) میزان فنول کل عصاره متانولی برگ واریته‌های مختلف زیتون (مغان، طارم، نور و رودبار) را به‌ترتیب ۵۷/۵، ۸۰، ۵۲/۵ و ۷۴/۵ mg GAE/g گزارش نمودند (Jafarian et al., 2014). در مطالعه Hayes و همکاران (۲۰۱۱) مشخص گردید که عصاره برگ زیتون حاوی ۱۶۰ فنول کل می‌باشد (Hayes et al., 2011). Kiritsakis و همکاران (۲۰۱۰) محتوای فنول کل برگ‌های زیتون سه واریته *O. koroneiki*، *O. kalamon* و *O. megaritiki* را به



شکل ۱- محتوای فنول کل (TPC) و فلاونوئید کل (TFC) عصاره اتانولی برگ زیتون.

Fig. 1. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of olive leaf ethanolic extract.

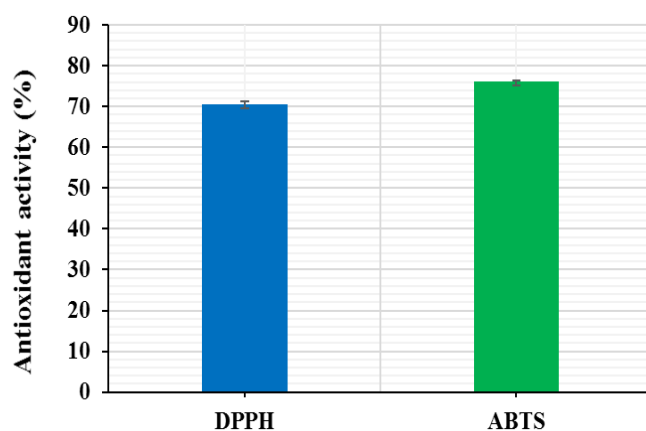
گزارش نمودند که عصاره آبی برگ زیتون قابلیت حفظ رنگدانه لیکوپن و ویتامین C در نوشیدنی آب گوجه‌فرنگی پالپدار طی زمان نگهداری را دارا می‌باشد و این اثر به فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی عصاره نسبت داده شد که سبب مهار رادیکال‌های آزاد، تأخیر واکنش اکسیداسیون و بقای بیشتر ترکیبات زیست فعال در محصول می‌گردد (Noktehsanj Avval et al., 2018). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که افزودن برگ زیتون واریته طارم به روغن کلزا به‌طور معنی‌داری سبب افزایش پایداری اکسایشی آن می‌گردد و این اثر به محتوای فنول بالای برگ زیتون مرتبط دانسته شد (Jafarian et al., 2014). Lins و همکاران (۲۰۱۸) غلظت مؤثر عصاره متانولی برگ زیتون در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS را به‌ترتیب ۱۳/۸ و ۱۶/۱ µg/mL گزارش نمودند (Lins et al., 2018). Lee و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی در عصاره برگ زیتون (الئوروپین، روتین، وانیلین و کافئیک اسید) را بصورت جداگانه یا ترکیبی، بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH، بررسی نمودند. این محققین بیان داشتند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی از ترتیب کافئیک اسید (۸۵/۷ درصد) < ترکیب فنولها (۵۸/۱ درصد) < روتین (۵۷ درصد) < الئوروپین

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ترکیبات پلی‌فنولی نقش بسیار مهمی در بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی ایفا می‌کنند. مطابق نتایج (شکل ۲)، عصاره اتانولی برگ زیتون بطور مؤثری سبب مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (۷۰/۶۲±۰/۵۹ درصد) و ABTS (۷۶/۱۵±۰/۴۳ درصد) گردید که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره را بازگو می‌کند. قابلیت عصاره برگ زیتون در مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH در مطالعات مختلف گزارش شده است (Benavente-Garcia et al., 2000; Silva et al., 2006). Hayes و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی لوتئین، سزامول، الاجیک اسید و عصاره متانولی برگ زیتون گزارش نمودند که قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات از روند الاجیک اسید < سزامول < عصاره برگ زیتون < لوتئین پیروی می‌نماید (Hayes et al., 2011). گزارش شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون ممکن است ناشی از حضور گروه‌های هیدروکسیل در ساختار ترکیبات موجود در عصاره شامل الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و لوتئولین-O-۷-گلوکوزید اسید باشد (Benavente-Garcia et al., 2000). Noktehsanj Avval و همکاران (۲۰۱۸)

جهت کنترل واکنش‌های اکسیداسیون در مواد غذایی حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع استفاده نمود.

(۵۵ درصد) < وانیلین (۵/۸ درصد) برخوردار می‌باشد (Lee and Lee, 2010). به دلیل ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره برگ زیتون با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه، این ترکیب زیست فعال را می‌توان



شکل ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه مهار رادیکال DPPH و ABTS.
Fig. 2. Antioxidant activity of olive leaf ethanolic extract based on inhibition of DPPH and ABTS radicals.

باکتری باسیلوس سرئوس با ۸ mg/mL و باکتری‌های *انتروباکتر ائروژنز* و *اشرشیا کلی* با ۳۲ mg/mL به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها در برابر عصاره برگ زیتون بودند که در راستای نتایج حاصل از روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار می‌باشد.

مطابق نتایج روش حداقل غلظت کشندگی، غلظت کمتری از عصاره اتانولی برگ زیتون (۱۲۸ mg/mL) جهت از بین بردن باکتری *باسیلوس سرئوس* مورد نیاز بود؛ در حالیکه باکتری *انتروباکتر ائروژنز* مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره بود و غلظت ۵۱۲ mg/mL برای از بین بردن آن نیاز بود. لازم به ذکر است که مقادیر حداقل غلظت کشندگی بالاتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود.

در راستای نتایج این مطالعه، گزارش شده است که مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی در برابر عصاره اتانولی برگ زیتون نسبت به انواع گرم مثبت احتمالاً ناشی از حضور غشاء‌های خارجی اطراف غشاء سلولی این نوع از باکتری‌ها می‌باشد که با کاهش سرعت نفوذ ترکیبات آبریز موجود در عصاره و اسانس‌های گیاهی به داخل سلول، منجر به افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به مواد ضد میکروبی می‌گردد (Alizadeh Behbahani et al., 2017; Alizadeh Behbahani et al., 2013; Alizadeh Behbahani et al., 2019; Tabatabaei Yazdi & Alizadeh Behbahani, 2013; Alizadeh Behbahani et al., 2018). Lee و همکاران (۲۰۱۰)، با بررسی فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی در عصاره برگ زیتون (ال‌توروپین، روتین، وانیلین و کافئیک اسید) بصورت جداگانه یا ترکیبی، بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار، نشان دادند که اثر ضد میکروبی مخلوط ترکیبات فنولی بطور معنی‌داری بالاتر از ترکیبات بصورت جداگانه بود که بیانگر اثر

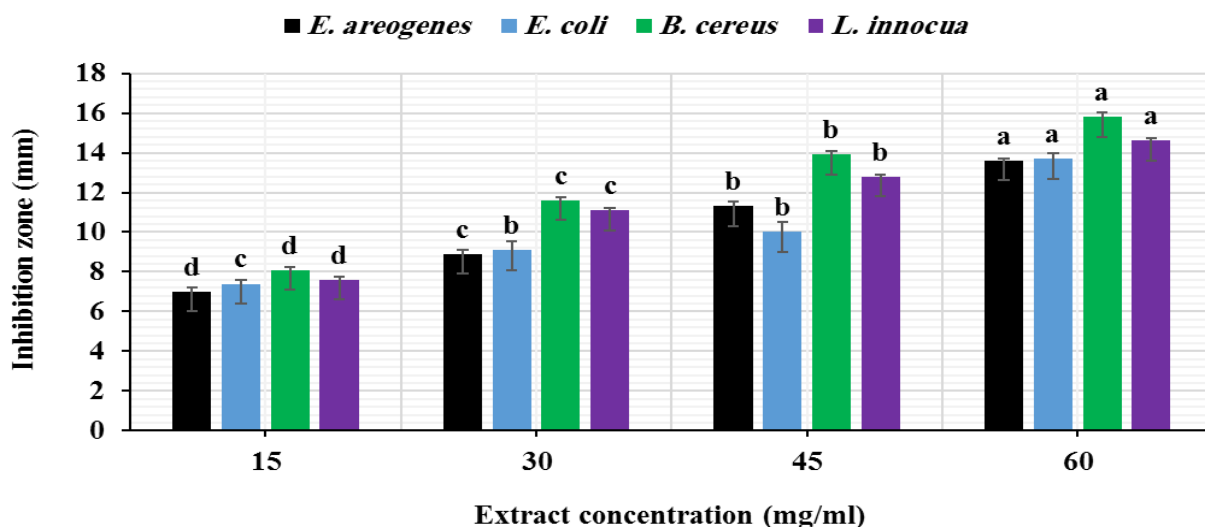
فعالیت ضد میکروبی

شکل ۳، نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار را نشان می‌دهد. همانطور که از نتایج مشخص است، اثر ضد میکروبی عصاره وابسته به غلظت و نوع باکتری بود. افزایش غلظت عصاره از ۱۵ mg/mL تا ۶۰ سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد گردید. تأثیر عصاره اتانولی بر باکتری‌های مورد مطالعه متفاوت بود و باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سرئوس* و *لیستریا اینوکوا*) نسبت به انواع گرم منفی (*انتروباکتر ائروژنز* و *اشرشیا کلی*) حساس‌تر بودند. در غلظت ۶۰ mg/mL عصاره، بالاترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *باسیلوس سرئوس* (۱۵/۸۰ mm)؛ حساس‌ترین باکتری) و کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *انتروباکتر ائروژنز* (۱۳/۶۰ mm)؛ مقاوم‌ترین باکتری) مشاهده گردید.

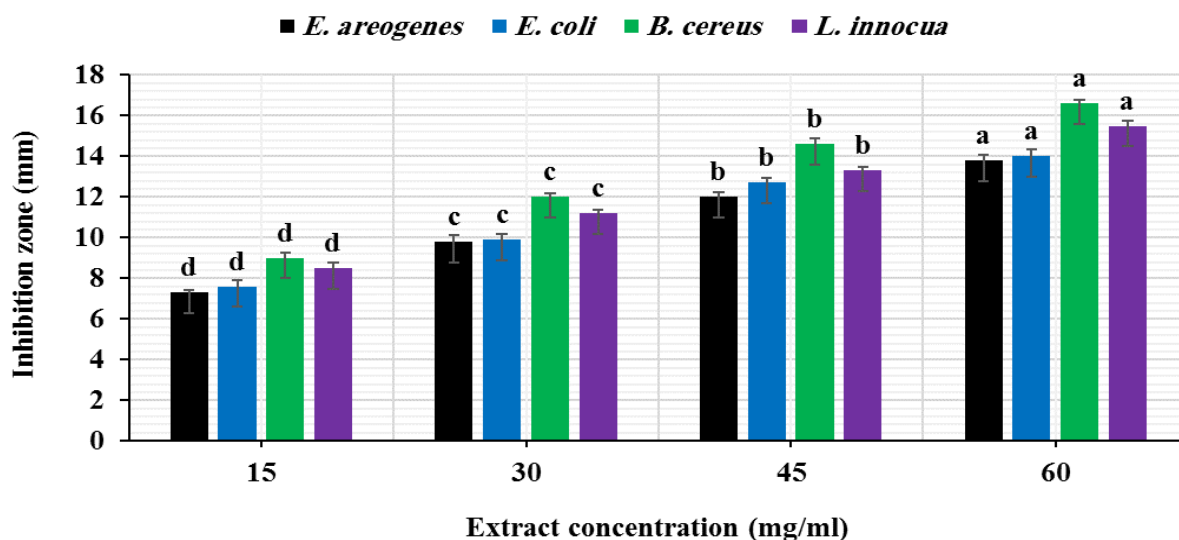
مطابق نتایج ضد میکروبی بر پایه روش چاهک آگار (شکل ۴)، قطر هاله عدم رشد بطور معنی‌داری با افزایش غلظت عصاره اتانولی برگ زیتون افزایش یافت و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی در برابر عصاره حساس‌تر بودند. به طوریکه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *انتروباکتر ائروژنز* به ترتیب بیشترین (۱۶/۶۰ mm) و کمترین (۱۳/۸۰ mm) قطر هاله عدم رشد را در غلظت ۶۰ mg/mL عصاره اتانولی برگ زیتون به خود اختصاص دادند. علاوه بر این، قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن آگار بالاتر بود.

نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر اساس روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در شکل ۵ ارائه شده است.

سینرژیستی بین ترکیبات فنولی در عصاره برگ زیتون می باشد (Lee and Lee, 2010).



شکل ۳- فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار.
Fig. 3. Antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract based on agar disk diffusion assay.



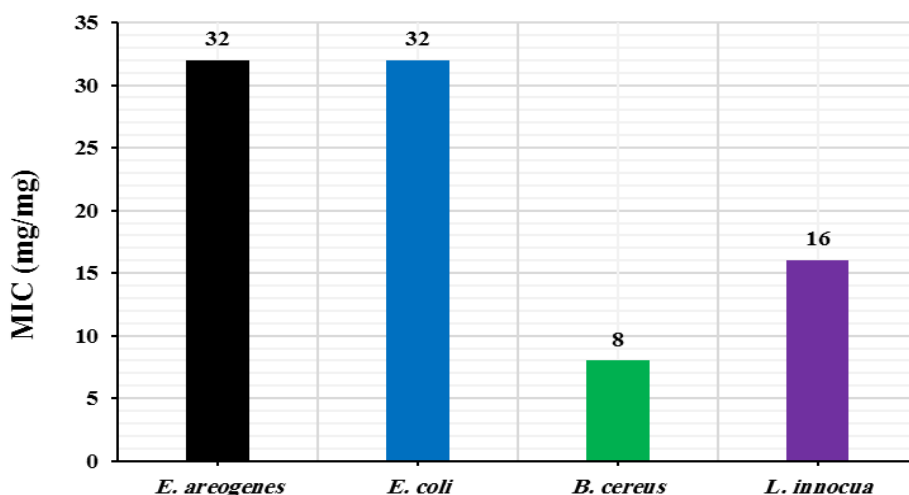
شکل ۴- فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش چاهک آگار.
Fig. 4. Antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract based on agar well diffusion assay.

بالتر می باشد و این اثر به میزان بالای ترکیبات فنولی استخراج شده در این روش نسبت داده شد (Rafiee et al., 2011). Pereira و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون بر باکتری های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس)، گرم منفی (سودوموناس اتروژینوزا، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیا) و قارچ (کاندیدا آلبیکنس و کریپتوکوکوس نئوفورمانس) نشان دادند که عصاره قادر به جلوگیری از رشد تمامی میکروارگانیسم های مورد مطالعه می باشد و باسیلوس سرئوس و کاندیدا

Keramatjou و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که افزودن عصاره برگ زیتون به کره سبب مهار رشد میکروارگانیسم های سرماگرا طی زمان نگهداری می گردد که این امر ناشی از حضور ترکیبات فنولی در عصاره استفاده شده می باشد (Keramatjou et al., 2013). Rafiee و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر روش های غرقابی و مایکروویو و نوع وارپته را بر ویژگی های ضد میکروبی عصاره برگ های زیتون در برابر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی را بررسی نمودند. این محققین گزارش دادند که فعالیت ضد میکروبی عصاره حاصل از روش مایکروویو

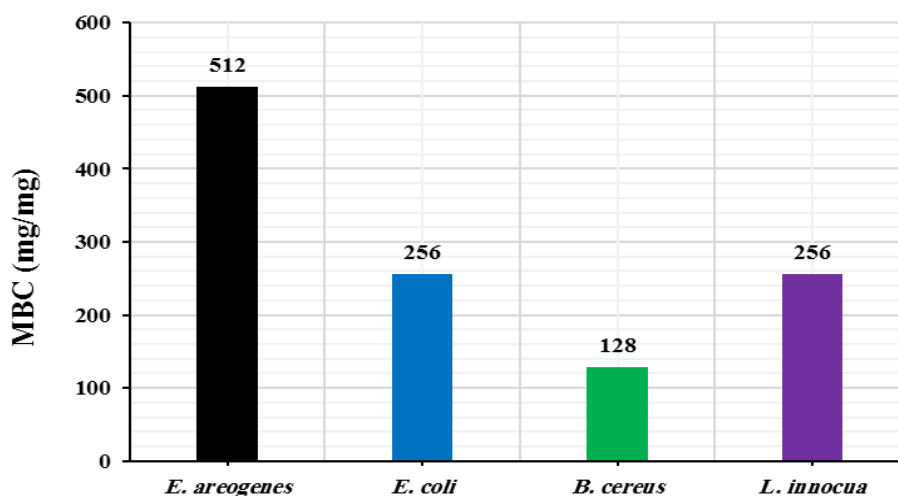
رشد باکتری‌های بیماری‌زای مجاری تنفسی و روده انسان می‌باشند (Bisignano et al., 1999). با توجه به نتایج، استفاده از عصاره برگ زیتون ممکن است خطر رشد میکروبی و عفونت/مسمومیت میکروبی در مواد غذایی و مجاری تنفسی و گوارشی را کاهش دهد.

آلبیکس حساس‌ترین گونه‌ها نسبت به عصاره بودند که در راستای نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. این محققین اثر ضد میکروبی عصاره را به حضور مقادیر بالای ال‌توروپین و دیگر ترکیبات فنولی در عصاره نسبت دادند (Pereira et al., 2007). علاوه بر این، ثابت شده است که ال‌توروپین و هیدروکسی تیروزول قادر به جلوگیری از رشد و یا کند کردن



شکل ۵- فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد.

Fig. 5. Antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract based on the minimum inhibitory concentration (MIC).



شکل ۶- فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون بر پایه روش حداقل غلظت کشندگی.

Fig. 6. Antimicrobial activity of olive leaf ethanolic extract based on the minimum bactericidal concentration (MBC).

باکتری‌های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس و لیستریا اینوکوا) در برابر عصاره اتانولی برگ زیتون نسبت به باکتری‌های گرم منفی (انتروباکتر اثرورزیز و اشرشیا کلی) حساس‌تر بودند. به طور کلی، عصاره اتانولی برگ زیتون قابلیت استفاده بعنوان غذا داروی طبیعی برای کنترل یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مولد فساد/ عفونت و واکنش‌های رادیکالی

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالای عصاره اتانولی برگ زیتون عمدتاً ناشی از حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در آن می‌باشد. عصاره اتانولی برگ زیتون قادر به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بود. همچنین،

تشکر و قدردانی

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.

در مواد غذایی و بدن انسان را دارا می‌باشد. با اینحال، مطالعات بیشتر و عمیق‌تری جهت تعیین مکانیسم اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی زیتون در شرایط آزمایشگاهی و درون بدنی نیاز می‌باشد.

منابع

1. Abbas Vali, M., Esmaili Kutmehr, M., Mushtaghi, H., & Eskandari, M. (2015). Comparison of the antibacterial effect of the leaf extracts of four varieties of olive (*Olea europaea*) on *Bacillus cereus*. *Food Hygiene*, 5(2), 41-52.
2. Abbas Vali, M., Esmaili Kutmehr, M., Mushtaghi, H., & Eskandari, M. (2015). Investigating the antibacterial effect of acetone, ethanol and methanol extracts of four Iranian olive varieties on *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 2(2), 67-77.
3. Aghajani, Z., & Khabarizadeh, M. (2015). The antioxidant activity of two varieties of olive leaves (Mission and Conservolia). *Scientific Research Applied Biology*, 5(18), 1-8.
4. Alizadeh Behbahani, B., & Shahidi, F. (2019). *Melissa officinalis* essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutrition and Food Sciences Research*, 6(1), 17-25.
5. 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.
6. 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. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2186>
7. Alizadeh Behbahani, B., Fallah, F., Ehaghi, A., Tabatabai Yazdi, F., & Mortazavi, S. (2019). Antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil on some food borne pathogens and determination of its chemical compounds, total phenol content, total flavonoids content and antioxidant potential. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(87), 291-304.
8. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. and Fallah, F. (2019). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.
9. Alizadeh Behbahani, B., 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>
10. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 847-863. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9456-3>
11. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaee Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M. M., & Vasiee, A. (2013). Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(3), 89-99.
12. Alizadeh Behbahani, B., 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>
13. 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>
14. Barzegar, H., Mehrnia, M. A., & Alizadeh Behbahani, B. (2017). 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 industries*, 16(90), 113-125.
15. Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., & Del Rio, J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457-462. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6)
16. Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. L., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 51(8), 971-974. <https://doi.org/10.1211/0022357991773258>
17. Del Río, J., Báidez, A., Botía, J., & Ortuno, A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry*, 83(1), 75-78. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00051-7)

18. Falah, F., Shirani, K., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2021). In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of Echinops setifer extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102102. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102102>
19. Hayes, J., Allen, P., Brunton, N., O'grady, M., & Kerry, J. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126(3), 948-955. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.092>
20. Jafarian, P., Asefi, N., & Teimori, R. (2014). Phenolic compounds content in leaf of different varieties of olive and its effect on stability of rapeseed oil, *Journal of food research*. 24(3), 307-314.
21. Karametjo, A., Hissari, J., Azadmard Demirchi, S., Prophet Doost, S., & Nemati, M. (2013). Antioxidant effect of olive leaf extract on butter stability. *Journal of Food Processing and Preservation*, 5(1), 81-94.
22. Keramatjou, E., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., & Peighambaroust, S.H. (2013). Antioxidant effect of olive leaf on stability of butter. *Journal of Food Processing and Preservation*, 5(1), 81-94.
23. Kiarsi, Z., Hojjati, M., Behbahani, B. A., & Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 40(3), e12782. <https://doi.org/10.1111/jfs.12782>
24. Kiritsakis, K., Kontominas, M., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., & Kiritsakis, A. (2010). Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(4), 369-376. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1517-x>
25. Lee, O.-H., & Lee, B.-Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource technology*, 101(10), 3751-375. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.052>
26. Lins, P. G., Pugine, S. M. P., Scatolini, A. M., & de Melo, M. P. (2018). In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon*, 4(9), e00805. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00805>
27. Majeed, M., & Prakash, L. (2006). Natural antimicrobials and preservatives: An emerging trend in personal care. *Soap Perfumery and Cosmetics*, 1, 87-92 .
28. Mallakian, S., Elhami Rad, A., Beyg Babaei, A., & Mohammadi, M. (2019). Antibacterial properties of olive leaf extracts extracted by subcritical water method on food borne pathogen. *Journal of Applied microbiology in food industries*, 5(2), 27-38.
29. Najafian, L., Haddad Khodaparast, M., & Alireza Qods Vali, A. (2007). Olive oil extraction from three olive varieties using enzyme processing. *Journal of food science and technology (Iran)*, 4(12), 45-53.
30. Noktehsanj Avval, M., Jahed, A., Mahdian, R., & Azari Anpar, M. (2018). Evaluation of the effect of olive leaf extract as a beneficial compound on the physicochemical, microbial and sensory characteristics of pulped tomato juice drink. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 10(4), 119-136.
31. Noshad, M., Hojjati, M., & Behbahani, B. A. (2018). Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial pathogenesis*, 116, 153-157. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.026>
32. Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., . . . Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162. <https://doi.org/10.3390/12051153>
33. Rafiee, Z., Jafari, S. M., Khomeiri, M., & Alami, M. (2011). Effect of variety and method of extraction on antioxidant and antimicrobial activity of olive leaf extracts. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*, 6(4), 297-308.
34. Romani, A., Ieri, F., Urciuoli, S., Noce, A., Marrone, G., Nediani, C., & Bernini, R. (2019). Health effects of phenolic compounds found in extra-virgin olive oil, by-products, and leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, 11(8), 1776. <https://doi.org/10.3390/nu11081776>
35. Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A., & Boas, L. V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 12(5), 385-395. <https://doi.org/10.1177/108201320607016>
36. 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. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 19(5), 463-484.
37. Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on Gram positive and Gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4), 56-62.
38. Tabatabaei Yazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A. R., Mortazavi, S. A., & Shahidi, F. (2018). Evaluation antioxidant activity, phytochemical constituents and antimicrobial of *Mentha Piperita* essential oil on some infectious and poisonous microorganisms. *Journal of food science and technology (Iran)*, 15(76), 67-76.

39. 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”. *Journal of food science and technology (Iran)*, 13(52), 131-145.



Formulation optimization of baguette containing *Ganoderma leucidum*

Saeid Azizkhani¹, Leila Nateghi^{2*} 

Received: 2021.11.02

Revised: 2022.01.26

Accepted: 2022.02.12

Available Online: 2022.02.12

How to cite this article:

Azizkhani, S., Nateghi, L. (2022). Formulation optimization of baguette containing *Ganoderma leucidum*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 615-630.

Abstract

Introduction: Nowadays, production and consumption of functional and dietary foods have increased. Today, the medicinal, antibacterial and antioxidant properties of fungi have been proven. *Ganoderma lucidum* is one of the fungi that has been known as the best medicinal fungus due to its various health benefits. *Ganoderma lucidum* is an annual medicinal fungus which belongs to the *Ganodermataceae* family. *G. lucidum* also known as Reishi in Japan, Ling-zhi in China, Ling chih, and Ling chi mushroom in other countries. It is popular among consumers in Japan and is widely used by Asian physicians and herbalists. This medicinal mushroom has been used in Asia for thousands of years to increase energy, stimulate the immune system, and promote health and longevity. In the US, *G. lucidum* is included in the American Herbal Pharmacopoeia and usually recommended for its immune-supporting effects. In Poland and other countries outside Asia, *G. lucidum* is used as a daily food supplement that adapts itself to correct imbalances in the body. Influenced by an increasing number of studies on *G. lucidum*, modern application of *G. lucidum* include but not limited to treatment of coronary heart disease, arteriosclerosis, hepatitis, arthritis, nephritis, bronchitis, hypertension, cancer and gastric ulcers. The major chemical constituents of *G. lucidum* are polysaccharides, triterpenes, sterols, lectins and some proteins having beneficial properties for the prevention and treatment of a variety of ailments. Both triterpenes and polysaccharides contain anticancer properties thus making them important nominees for the researches. Spores, fruiting body and mycelium have been investigated for biological active compounds. *Ganoderma lucidum* is a kind of mushroom known to have various therapeutic properties such as lowering high blood sugar and high blood pressure, boosting the immune system as well as its antibacterial and antioxidant effects.

In recent years, a number of researches were performed for the identification of biological compounds and medicinal properties of *Ganoderma lucidum*.

Materials and Methods: In this study, baguette bread with 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 % *Ganoderma lucidum* powder was used in baguette bread formulation. The aim of this study was to investigate the possibility of enriching baguette bread using *Ganoderma lucidum* and to investigate the physicochemical, rheological, texture analysing, microbial, stale and sensory evaluation properties. Therefore, 5 treatments were designed with a control treatment and tests were performed on the treatments in three replications. In order to analyze the data, one-way ANOVA analysis of variance and Duncan at 95% confidence level were used in Minitab 16 software.

Results and Discussion: Examination of the rheological properties of the dough showed that different percentages of *Ganoderma lucidum* significantly affect the rheological characteristics of the dough ($p \leq 0.05$) and addition of *Ganoderma lucidum* reduced the above indices. According to the results, addition of *Ganoderma lucidum* caused a significant increase ($p \leq 0.05$) of phenolic compounds and fiber in bread samples. The results of microbial evaluation showed that with

1. MSC Student, Department of Food Science and Technology, Varamin-pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Varamin-pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

(*Corresponding Author Email: leylanateghi@yahoo.com)

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.73383.1109](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.73383.1109)

increasing *Ganoderma lucidum* level in baguette bread, the number of coliforms and molds in the treatments decreased significantly ($p \leq 0.05$). The results of sensory evaluation showed that the increase of *Ganoderma lucidum* level in baguette samples caused a slight decrease in taste, color, odor and general acceptance compared to the control sample.

Fungi are rich in protein, pigment, carbohydrates, fatty acids, vitamins and minerals that can be used in food enrichment. Due to the growing human tendency to use natural substances, fungi can be a suitable source to meet this need. According to the results, up to 2.5 % of *Ganoderma lucidum* can be added to baguette bread formula and higher fiber content, more phenolic compounds, more freshness, less microbial load in baguette bread were obtained without having an adverse effect on its sensory properties. Therefore, the treatment mentioned in this study was selected as the best treatment in terms of safety, health and quality properties.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, enrichment, baguette, phenolic compounds.

مقاله علمی-پژوهشی

بهینه‌سازی فرمولاسیون نان باگت با گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma leucidum*)

سعید عزیزخانی^۱ - لیلا ناطقی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳

چکیده

امروزه خواص زیست فعال بسیاری از قارچ‌ها به اثبات رسیده است. یکی از قارچ‌هایی که به لحاظ دارا بودن خواص درمانی متعدد به عنوان بهترین قارچ دارویی نام گذاری شده است قارچ گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma leucidum*) است. از آنجا که تولید و مصرف مواد غذایی رژیمی و فراسودمند رو به افزایش است و با توجه به وجود ترکیبات فراسودمند موجود در قارچ گانودرما، این قارچ می‌تواند گزینه‌ای مناسب جهت تولید محصولات غذایی فراسودمند به حساب آید. لذا هدف از این تحقیق بررسی امکان غنی‌سازی نان باگت با قارچ گانودرما در سطوح (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد) به جای آرد و بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی (درصد خاکستر، رطوبت، فیبر، اسیدیته و pH)، خواص رئولوژیکی (شاخص‌های مقاومت خمیر، طول کشیده شدن خمیر، کشش پذیری خمیر، ضریب ایندکس، الاستیسیته، زمان پایداری خمیر و انرژی پخت)، بافت‌سنجی (پیوستگی، فنری، صمغیت، قابلیت جویدن، چسبندگی و سختی)، ترکیبات فنلی، بیانی نان، خواص میکروبی (کپک و کلی‌فرم) و حسی آن بود. بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی نشان داد با افزایش میزان قارچ گانودرما سطح ۲/۵ درصد در آرد نان باگت، شاخص‌های خاکستر، رطوبت، فیبر و اسیدیته افزایش و شاخص pH کاهش یافت. بررسی خواص رئولوژیکی خمیر نشان داد درصدهای مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم بر تمامی شاخص‌های رئولوژیکی خمیر معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$) و افزودن قارچ باعث کاهش مقادیر شاخص‌های فوق گردید. نتایج بررسی بافت‌سنجی نشان داد با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم تا سطح ۲/۵ درصد، شاخص پیوستگی، فنری، صمغیت، قابلیت جویدن و سختی نمونه‌ها کاهش و شاخص چسبندگی افزایش یافت. مطابق با نتایج افزودن قارچ و افزایش میزان آن تا سطح ۲/۵ درصد باعث افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی و فیبر در نمونه‌های نان گردید ($p \leq 0.05$). نتایج ارزیابی میکروبی نشان داد با افزایش قارچ به نان باگت و افزایش میزان آن تعداد کلی فرم‌ها و کپک در تیمارها به صورت معنی‌دار کاهش یافت ($p \leq 0.05$). بررسی نتایج ارزیابی حسی نشان داد افزایش قارچ تا میزان ۲/۵ درصد به نمونه‌های نان باگت باعث اندکی کاهش در امتیاز مزه، رنگ، بو و پذیرش کلی در مقایسه با نمونه شاهد گردید. با توجه به نتایج می‌توان تا ۲ درصد به نان باگت قارچ اضافه نمود و از میزان بالاتر فیبر، ترکیبات فنلی، بیانی و بار میکروبی کمتر آن در نان باگت بهره جست بدون اینکه اثر نامطلوب روی خواص حسی آن داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: غنی‌سازی، نان باگت، قارچ گانودرما لوسیدوم، *Ganoderma leucidum*.

مقدمه

مثبتی در تأمین سلامتی بدن داشته باشد (Peighambarpour et al., 2012). امروزه با توجه به گسترش محصولات جدید و متنوع در صنایع غذایی، اکثر افراد خواهان غذاهایی هستند که با الگوهای متداول تغذیه‌ای هماهنگ بوده ضمن آن که برای سلامتی نیز سودمند باشند. نان‌های صنعتی، ضایعات بسیار ناچیزی در مقابل سایر نان‌ها داشته و به دلیل کیفیت بالای پخت، تنوع گسترده محصول، ماندگاری مناسب و انجام مرحله کامل تخمیر خمیر از جایگاه غذایی مناسبی برخوردار هستند. از مهم‌ترین انواع نان‌های صنعتی، می‌توان به نان تست و باگت

فرآورده‌های حاصل از غلات نقش مهمی در فرهنگ غذایی اکثر کشورها ایفا می‌کنند و در واقع غذای اصلی عمده‌ی جمعیت جهان می‌باشد. نان به عنوان ارزان‌ترین منبع انرژی و پروتئین در تغذیه قسمت اعظم مردم جهان نقش حیاتی دارد (Chen et al., 2017). نان حاوی مقادیر زیادی کربوهیدرات و پروتئین است ولی از نظر موادی مانند فیبرهای رژیمی، اسیدهای چرب غیراشباع و ترکیبات فنلی فقیر می‌باشد. بنابراین، غنی‌سازی نان با سایر مواد و دانه‌ها می‌تواند نقش

* نویسنده مسئول: Email: leylanateghi@yahoo.com
DOI: 10.22067/iftstrj.2022.73383.1109

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

اشاره نمود که از نان‌های پرمصرف در جهان، به خصوص در کشورهای اروپایی و آمریکایی می‌باشد (Artiga-Artigas et al., 2017). در سال‌های اخیر، تولیدکنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی از جمله پودر، عصاره^۱ و اسانس‌های گیاهی^۲ به جای نگهدارنده‌های شیمیایی در محصولات خود نموده‌اند. از مهم‌ترین گیاهانی که خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن به اثبات رسیده، قارچ گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma leucidum*) است (Chen et al., 2017).

قارچ گانودرما لوسیدوم با نام‌های لینگری در چین و ریشی در ژاپن، به عنوان یک قارچ دارویی با ارزش شناخته شده می‌باشد. کلمه لاتین لوسیدوم^۳ (براق یا درخشان) اشاره به ظاهر قارچ دارد (Martins et al., 2014). این قارچ جزء یکی از مهم‌ترین رستنی‌ها در طب سنتی چین محسوب می‌شود به طوری که همراه با رستنی‌های دیگر و با به تنهایی برای مصارف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله خواص آن، می‌توان به خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدحساسیت، ضدتوموری، تقویت سیستم ایمنی، کاهش قند و فشارخون و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی (به دلیل وجود ترکیبات فنلی مانند پلی‌فنل و فلاونوئید) و ... اشاره نمود (Chen et al., 2017). Saltarelli و همکاران (۲۰۰۹) مطالعه‌ای جهت بررسی خواص آنتی‌اکسیدان قارچ گانودرما لوسیدوم انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در قارچ گانودرما لوسیدوم در پیشگیری و کنترل بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری قلبی و سرطان مؤثر است که وجود پلی‌فنل‌ها در قارچ گانودرما لوسیدوم علت این فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. آن‌ها اذعان داشتند که خاصیت آنتی‌اکسیدان این مواد به علت فعالیت احیاکنندگی و جذب رادیکال‌های اکسیژن می‌باشد (Saltarelli et al., 2009). بررسی‌های آن‌ها در خصوص عصاره اتانولی این قارچ نشان داد که این عصاره، حاوی مولکول‌های کم وزن دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی می‌باشد، علاوه بر آن عصاره متانولی و عصاره آبی حاوی پلی‌ساکاریدهای گانودرما نیز می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشد.

امروزه غنی‌سازی نان یکی از اهداف مهم صنایع نانویی بوده و تحقیقات زیادی در زمینه غنی‌سازی نان در حال انجام است. به عنوان مثال، Yasamani Farimani و همکاران (۲۰۲۰) کیفیت و ویژگی‌های فیزیکی و حسی کیک‌های کوچک حاوی موسیلاژ گل ختمی را بررسی نمودند (Yasamani Farimani et al., 2020). نتایج نشان داد که افزودن موسیلاژ گل ختمی به طور قابل توجهی خواص فیزیکی کیک‌ها (محتوای رطوبت، حجم ویژه و چگالی و ویسکوزیته

خمیر) را در مقایسه با نمونه شاهد بهبود بخشید. سختی در طول ذخیره سازی با افزودن موسیلاژ به طور قابل توجهی کاهش یافت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها برای پارامتر رنگ نشان داد که کمترین مقدار L^* و بیشترین L^* پوسته مربوط به نمونه شاهد و نمونه‌هایی بود که دارای ۰/۲۵ و ۱ درصد موسیلاژ گل ختمی بودند. Hesarinejad و همکاران (۲۰۱۷) اثر سطوح مختلف پودر جلبک کلرلا و لگاریس به عنوان جایگزین سفیده تخم مرغ بر ویژگی‌های فیزیکی و حسی کیک اسفنجی را بررسی کرده و نتایج نشان داد که امکان جایگزینی بخشی از سفیده تخم مرغ در فرمولاسیون کیک با پودر جلبک کلرلا و لگاریس وجود دارد. جایگزین کردن ۲۵ درصد وزنی سفیده تخم مرغ با پودر جلبک ذکر شده، علاوه بر ایجاد مزایای تغذیه‌ای نسبت به نمونه شاهد، از نظر ارزیابی حسی، تفاوت معنی‌داری را با نمونه شاهد ایجاد نکرد. اما تمام ویژگی‌های کیفی را با افت شدید مواجه کرد (Hesarinejad et al., 2017). Gani و همکاران (۲۰۱۴) غنی‌سازی نان با ترکیبات پلی‌فنلی و تأثیر ترکیبات پلی‌فنل بر خصوصیات فیزیکی نان را بررسی کردند. نتایج نشان داد افزودن پلی‌فنل‌ها باعث تغییر در میزان جذب آب، سفتی نان، حجم مخصوص شد که این تغییرات به دلیل تأثیر ترکیبات پلی‌فنلی بر روی ساختار گلوتن و نشاسته آرد است. بر اساس آنالیزهای دستگاه فارینوگراف مشخص شد که نان‌های غنی‌شده با پلی‌فنل نسبت به نان شاهد میزان جذب آب بیشتری دارند. مقاومت به کشش بالا می‌رود و قابلیت کشش‌پذیری خمیر کاهش می‌یابد. همچنین نتایج حاصل از آنالیزهای حسی نشان داد که این نان‌ها دارای عطر و طعم بهتری نسبت به نان‌های کنترل شده هستند (Gani et al., 2014). در تحقیقی دیگر، Nasrabadi و Nori Topkanloo (۲۰۲۰) تأثیر جایگزینی آرد گندم با پودر سنجد کامل بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی نان تست را بررسی و گزارش نمودند نمونه‌ی حاوی ۸ درصد پودر سنجد به دلیل خواص بافتی و حسی بهتر، فیبر بیشتر و در نتیجه دریافت کالری کمتر، نسبت نمونه شاهد پیشنهاد می‌شود (Nasrabadi and Nori Topkanloo, 2020). Nateghi (۲۰۱۷) تأثیر استفاده از هیدروکلوئید کربوکسی متیل سلولوز و امولسیفایر دی استل تارتاریک اسید بر خواص فیزیکوشیمیایی، حسی و ماندگاری نان تست غنی شده با آرد لوبیا چیتی و نخود را بررسی و گزارش نمودند استفاده از ۵ درصد آرد لوبیا چیتی و ۱ درصد کربوکسی متیل سلولوز نسبت به وزن کل آرد، در فرمولاسیون نان تست غنی‌شده توصیه می‌گردد (Nateghi, 2017).

همان‌طور که گفته شد، در سال‌های اخیر تولیدکنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی با منشأ گیاهی و میکروبی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی در محصولات خود نموده‌اند.

سپیدخوش (ایران) استفاده شد. همچنین از اتانول، فنل فتالین، اسید سولفوریک، سدیم هیدروکسید، هگزان، هیدروکلریک اسید، قرص رینگر، پتاسیم کلریک، محیط کشت VRBL، پتاس، سدیم استات و الکل اتیلک استفاده شد که همگی از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

روش تهیه نان باگت

برای تهیه نان باگت شاهد آرد گندم (۱۰۰ درصد)، شکر، نمک، مخمر، و بهبوددهنده به ترتیب ۱، ۱/۵، و ۱/۵ درصد وزنی آرد و مقدار آب لازم تعیین شده توسط دستگاه آلوتولب (شوین، فرانسه)، در میکسر (D-1123، ژاپن) مخلوط و سپس خمیر فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به منظور انجام عمل تخمیر قرار داده شد. بعد از انجام تخمیر، به چانه‌های ۱۰۰ گرمی تقسیم و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد برای تخمیر میانی قرار گرفت، در مرحله بعدی چانه‌ها به صورت لوله‌ای درآمده و ۲۰ دقیقه تخمیر نهایی شدند. در نهایت پخت به مدت ۱۵ دقیقه در فر گردان با سیستم بخار مخصوص (راک، ایران) با دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام و نان‌های حاصل پس از سرد شدن در کیسه‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی شدند. به منظور تهیه تیمارهای مورد آزمون غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد وزنی آرد مصرفی در فرمولاسیون تیمار شاهد با پودر قارچ گانودرما لوسیدوم مطابق با جدول ۱ جایگزین شد (Nasehi et al., 2015). لازم به ذکر است غلظت‌های مذکور بر اساس پیش تیمار با هدف دستیابی به خواص کیفی خمیر و نان باگت مطلوب تعیین گردید.

اسانس، عصاره و پودرهای گیاهی به دلیل داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی از قبیل ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی را از خود نشان می‌دهند. این ترکیبات به طور گسترده در گیاهان وجود داشته و علاوه بر افزایش کیفیت ماده غذایی، از عوامل ایجاد رنگ، طعم و مزه نیز می‌باشند. طبق تحقیقات به عمل آمده قارچ گانودرما لوسیدوم دارای خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالایی است. که در حال حاضر تحقیقات اندکی در ارتباط با بررسی ترکیبات مؤثره آن در جهان انجام شده است و در مورد استفاده از عصاره یا پودر این قارچ در فرمولاسیون نان باگت و بررسی بر ویژگی‌های آن تحقیقی انجام نگرفته است. بنابراین، با توجه به مطالب ذکر شده، هدف کلی از تحقیق حاضر بررسی امکان استفاده از پودر قارچ گانودرما لوسیدوم در نسبت‌های (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد) در نان باگت و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (درصد خاکستر، رطوبت، فیبر، اسیدیته و شاخص pH)، خواص رئولوژیکی (شاخص‌های مقاومت خمیر، طول کشیده شدن خمیر، کشش‌پذیری خمیر، ضریب ایندکس، الاستیسیته، زمان پایداری خمیر و انرژی پخت)، بافت‌سنجی (پیوستگی، فنریت، صمغیت، قابلیت جویدن، چسبندگی و سختی)، ترکیبات فنلی، بیاتی نان، خواص میکروبی (کپک و کلی‌فرم) و حسی محصول نهایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای تهیه نان باگت از نمک و شکر شرکت گل‌ها (ایران)، مخمر شرکت فریمان (ایران)، بهبوددهنده شرکت رازی (ایران)، آرد گندم شرکت صنایع آرد ورامین (ایران) و قارچ گانودرما لوسیدوم شرکت

جدول ۱- تیمارهای مورد آزمون حاوی غلظت‌های مختلف آرد گندم، قارچ گانودرما لوسیدوم و شاهد

Table 1- Tested treatments containing different concentrations of wheat flour, *Ganoderma lucidum* mushroom and control

نمونه	آرد گندم (%)	گانودرما لوسیدوم (%)
Treatment	Wheat flour (%)	<i>Ganoderma lucidum</i> (%)
T ₁	100	0
T ₂	99.5	0.5
T ₃	99	1
T ₄	98.5	1.5
T ₅	98	2
T ₆	97.5	2.5

خواص رئولوژیکی خمیر نمونه‌های نان باگت

ارزیابی خواص رئولوژیکی، توسط دستگاه آلوتولب (شوین، فرانسه) انجام شد. بدین منظور مقدار ۲۵۰ گرم آرد توزین شده و بر حسب درصد رطوبت آرد، آب نمک ۲/۵ درصد اضافه گردید و در مخلوط‌کن دستگاه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد همزده شد. سپس خمیر حاصله به ۵ قطعه گرد تقسیم شده و هر یک از قطعات به طور جداگانه در محفظه دستگاه قرار داده شد تا درون آن هوا دمیده شود. با روشن کردن دستگاه آلوتولب

آزمون‌های فیزیکوشیمیایی آرد نان‌های باگت

برای ارزیابی رطوبت، خاکستر، pH و اسیدیته به ترتیب از استانداردهای ملی ایران به شماره‌های ۲۷۰۵، ۲۷۰۶ و ۳۷ استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری فیبر آرد نان باگت و نمونه‌های نان از روش ذکر شده در استاندارد AACC 35-05 (AOAC, 2000) استفاده شد.

داوران نمونه‌ها را در زمان‌های ۲۴، ۴۷ و ۷۲ ساعت پس از پخت، ارزیابی کردند و امتیازها را با رتبه‌بندی به‌صورت ۵، ۴، ۳، ۲، ۱ به‌ترتیب برای بسیار خوب، خوب، متوسط، بد، بسیار بد در نظر گرفته شد. ارزیابی‌ها بین ارزیابی هر نمونه از آب برای شستشوی دهان استفاده نمودند (Nasehi et al., 2009).

آزمون میکروبی

شمارش کلی‌فرم‌ها

ارزیابی شمارش کلی‌فرم‌ها در نمونه‌های نان مشابه روش به‌کار رفته برای آنالیز کپک و مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۹۲۶۳ انجام گردید. بدین ترتیب ۱۰ گرم نمونه همراه با ۹۰ میلی‌لیتر پپتونوتر در داخل کیسه استومیکر قرار داده شد و مخلوط حاصل با دستگاه میکسر (D-1123، ژاپن) به مدت ۱ دقیقه مخلوط گردید. سوسپانسیون فیلتر شده حاصل سپس در رقت‌های مختلف ساخته و از ۳ رقت مختلف، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه بر روی سطح محیط کشت انتخابی جامد VRBL منتقل شد. پلیت‌های کشت داده شده در انکوباتور (Shimaz، ایران) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و در نهایت کلنی‌ها شمارش و با واحد به‌صورت Log cfu/g گزارش شدند (ISIR, 2009).

شمارش کلی کپک‌ها

ارزیابی شمارش کپک و مخمرها در نمونه‌های نان مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۵۲۷۲، انجام گردید. بدین ترتیب ابتدا ۱۰ گرم از نمونه مورد آزمایش در شرایط سترون توزین و سپس به‌هاون چینی منتقل گردید. آنگاه ۹۰ سی‌سی محلول تریپتون واتر برات ۱ درصد به آن افزوده و کاملاً همگن تا محلول یکنواختی تهیه شود. با استفاده از پی‌پت سترون ۱ سی‌سی، ۰/۱ سی‌سی از سوسپانسیون اولیه را به یک پلیت حاوی محیط کشت DG₁₈ انتقال داده شد. پلیت‌های کشت داده شده را به‌صورت هوازی، با در پوش بالا و ایستاده در انکوباتور (Shimaz، ایران) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری و در صورت لزوم، پلیت‌ها برای مدت زمان ۱ الی ۲ روز در معرض نور غیرمستقیم روز قرار داده شدند. پلیت‌ها بین مدت زمان ۲ تا ۵ روز پس از گرمخانه‌گذاری بررسی و شمارش شدند (ISIR, 2007).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور آزمایش و تجزیه و تحلیل داده‌ها از طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار استفاده شد و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون

فشار هوا در داخل خمیر را به ازای زمان دمیدن اندازه‌گیری می‌کند و قدرت خمیر، کشسانی، الاستیسیته، انرژی پخت و حداکثر قوام خمیر و مدت پایداری خمیر اندازه‌گیری و به‌صورت گراف ترسیم گردید (AACC, 2010).

آزمون بافت‌سنجی نان باگت (اینستران)

تغییرات بافت مطابق با استاندارد AACC به شماره ۷۴-۰۹، تحت آزمون فشردگی یک مرحله‌ای توسط دستگاه بافت‌سنج یا اینستران (بروکفیلد، آمریکا) انجام شد. در این روش نمونه‌های نان با ابعاد تقریبی (۵۰ × ۲۰ × ۱۰ سانتی‌متر) با دقت از قسمت مغز نان بریده شد سپس توسط پروب استوانه‌ای به قطر ۱/۲۷ سانتی‌متر و با نمونه فشار آورنده ثابت ۵۰ نیوتن و بر حسب ۵۰ درصد فشردگی نمونه برای تعیین نقطه نهایی با سرعت ۶۰ میلی‌متر در دقیقه انجام شد. و خصوصیات بافتی نمونه‌ها از نظر پیوستگی، فنریت، صمغیت، قابلیت جویدن، چسبندگی و سختی مورد ارزیابی قرار گرفت (AACC, 1995).

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی

محتوای ترکیبات فنلی از طریق روش فولین سیوکالتیو انجام شد. غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از نمونه تهیه و با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم‌زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه گردید. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV 2100، آلمان) ماوراءبنفش در ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به‌منظور ترسیم منحنی استاندارد اسید گالیک غلظت‌های مختلف اسید گالیک ۱۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ میلی‌گرم/گرم آماده گردید و پس از انجام مراحل آزمون مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد و منحنی کالیبراسیون و معادله خط ($Y = 0.0044X + 0.03536$) آن بدست آمد. مقدار جذب نمونه‌های مورد آزمون در معادله خط مربوط به منحنی استاندارد قرار داده شد و میزان فنل کل به‌صورت میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم نمونه گزارش گردید (Vaher et al., 2010).

ارزیابی بیاتی نمونه‌های نان باگت به روش حسّی

میزان بیاتی (کاهش تازگی)، و ویژگی‌های رنگ، بافت، مزه، بو و پذیرش کلی نمونه‌های نان باگت با استفاده از آزمون ارزیابی حسّی بررسی گردید. در این روش ابتدا نمونه‌های نان برش داده شد و کدگذاری گردیدند سپس توسط ۱۰ نفر ارزیاب نیمه آموزش دیده با روش هدونیک پنج نقطه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین ترتیب

چنددامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب ۱۶ در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

خواص فیزیکی‌وشیمیایی آرد نمونه‌های نان باگت

تغییرات خواص فیزیکی‌وشیمیایی آرد نمونه‌های نان حاوی درصد‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق با نتایج با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم در آرد نان باگت، شاخص‌های خاکستر، فیبر و اسیدیته افزایش و شاخص pH به صورت معنی‌داری ($p \leq 0.05$) کاهش یافت. نتایج نشان داد با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم در آرد نان باگت، میزان رطوبت اندکی افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). تحقیقات نشان داده است قارچ گانودرما لوسیدوم به دلیل داشتن ترکیبات معدنی از جمله کلسیم، آهن، پتاسیم، منیزیم، سلنیوم، مس و روی به‌طور تقریبی حاوی ۸-۱۰ درصد خاکستر است (Wachtel-Galor et al., 2011). بنابراین افزایش مقدار این قارچ در تیمارهای تحقیق می‌تواند باعث افزایش خاکستر نمونه‌ها شود. در پژوهشی دیگر Mau و همکارانش (۲۰۰۱) گزارش کردند قارچ گانودرما لوسیدوم حاوی ۸ درصد خاکستر، ۲۶-۲۸ درصد کربوهیدرات، ۵-۳ درصد چربی و ۸-۷ درصد پروتئین می‌باشد (Mau et al., 2001). افزایش فیبر نمونه‌های نان باگت در اثر افزایش قارچ گانودرما لوسیدوم را می‌توان به علت دانست که قارچ‌ها حاوی ۳-۳۲ درصد فیبر

هستند (Wachtel-Galoret et al., 2011). بنابراین با افزایش قارچ گانودرما لوسیدوم در تیمارهای تحقیق می‌تواند باعث افزایش فیبر در نمونه‌ها گردد. Mau و همکاران نیز در سال (۲۰۰۱) طی تحقیقی نشان دادند قارچ گانودرما لوسیدوم حاوی ۵۹ درصد فیبر می‌باشد (Mau et al., 2001). مطابق با نتایج پژوهش حاضر، مقدار فیبر در نمونه‌های حاوی مقادیر بیشتر قارچ گانودرما لوسیدوم بیشتر بود همچنین نتایج نشان داد افزودن قارچ گانودرما لوسیدوم منجر به افزایش رطوبت در نمونه‌های مرتبط شد. جذب آب بیشتر در نمونه‌ها می‌تواند باعث تحریک یون‌های هیدروژن شده که منجر به کاهش pH نمونه‌های نان شود. در تحقیقات مشابه Ebadi Molabashi و Nateghi (۲۰۱۸) تاثیر صمغ دانه شاهی بر بهبود ویژگی‌های فیزیکی‌وشیمیایی و حسی شیرینی برنجی را بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد افزودن صمغ دانه شاهی باعث کاهش pH، افزایش فعالیت آبی و اسیدیته نمونه‌ها نسبت به نمونه شاهد طی دوره نگهداری شد (Ebadi Molabashi and Nateghi, 2018).

درصد‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم جایگزین آرد مصرفی در نمونه‌های نان باگت شد و چون قارچ تهیه شده به صورت پودر بوده نمی‌تواند تأثیر معنی‌داری در مقدار رطوبت نمونه‌ها داشته باشد و افزایش جزئی رطوبت در نمونه‌ها می‌تواند مربوط به محتوی بالای رطوبت قارچ گانودرما نسبت به آرد باشد.

جدول ۲- بررسی خواص فیزیکی‌وشیمیایی آرد نان باگت حاوی غلظت‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم و شاهد

Table 2- Investigating the physicochemical properties of baguette flour containing different concentrations of *Ganoderma lucidum* mushroom and control

نمونه Treatment	pH	اسیدیته (%) (اسید لاکتیک) Acidity (% lactic acid)	فیبر (%) Fiber (%)	رطوبت (%) Moisture (%)	خاکستر (%) Ash (%)
T ₁	6.590± 0.010 ^a	2.240± 0.010 ^f	1.687± 0.003 ^f	13.296± 0.020 ^a	0.498± 0.064 ^b
T ₂	6.490± 0.010 ^b	2.070± 0.010 ^e	1.779± 0.003 ^e	13.297± 0.050 ^a	0.480± 0.003 ^b
T ₃	6.363± 0.032 ^c	2.290± 0.010 ^d	1.871± 0.003 ^d	13.323± 0.045 ^a	0.510± 0.003 ^b
T ₄	6.220± 0.010 ^d	2.390± 0.010 ^c	1.963± 0.003 ^c	13.327± 0.050 ^a	0.530± 0.003 ^{ab}
T ₅	6.120± 0.010 ^e	2.490± 0.010 ^b	2.055± 0.003 ^b	13.376± 0.025 ^a	0.540± 0.003 ^{ab}
T ₆	5.990± 0.026 ^f	2.600± 0.010 ^a	2.147± 0.003 ^a	13.406± 0.090 ^a	0.590± 0.003 ^a

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. ^{a-f} حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هرستون می‌باشد.

The results are shown as mean ± standard deviation. ^{a-f} Lowercase letters indicate significant difference in column.

که باعث کاهش مقاومت خمیر تحت تأثیر آنزیم آلفا‌آمیلاز و تشکیل مالتوز توسط هیدرولیز نشاسته شده است (Jascanu and Stefoane, 2012). همچنین طول کشیده شدن خمیر با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. در واقع این طور می‌توان بیان نمود که کاهش طول کشیده شدن خمیر با افزودن قارچ گانودرما لوسیدوم به دلیل کاهش پروتئین‌های

خواص رئولوژیکی خمیر نان باگت

تغییرات خواص رئولوژیکی خمیر نمونه‌های نان حاوی درصد‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم در جدول ۳ نشان داده شده است. مطابق با نتایج با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، میزان مقاومت خمیر در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) کاهش یافت که به علت وجود آنزیم آلفا‌آمیلاز در نمونه‌های قارچ گانودرما لوسیدوم بوده

گلوتهی، بوده است. همچنین می‌توان اینطور بیان نمود که قارچ گانودرما لوسیدوم به تنهایی ویژگی تشکیل خمیر را نداشته و از طرفی منجر به مختل شدن کمپلکس پروتئین نشاسته و تضعیف خمیر نان حاصله می‌گردند (Funami, 2009). با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم و به علت وجود آنزیم آلفا آمیلاز در نمونه‌های قارچ گانودرما لوسیدوم سبب تشکیل مالتوز توسط هیدرولیز نشاسته شده که باعث افزایش مقدار آب آزاد در خمیر و در نتیجه کاهش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) ثبات خمیر، کشش‌پذیری خمیر نسبت به تیمار شاهد شد (Jascanu and Stefoane, 2012; Whitehurst and Oort, 2010).

نتایج مقایسه میانگین نمونه‌ها نشان داد میزان ضریب ایندکس با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) کاهش یافت. و میزان ضریب ایندکس تیمار شاهد بالاتر از سایر نمونه‌ها بود. Rasti و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تاثیر بتاگلوکان جو بر برخی خواص رئولوژیکی آرد گندم بیان نمودند با افزایش میزان بتاگلوکان مقاومت خمیر نسبت به کشش افزایش می‌یابد که ناشی از قوی بودن شبکه گلوتهی خمیر و افزایش استحکام آن است (Rasti et al., 2011). مطابق با نتایج با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، الاستیسیته به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0.05$). اینگونه می‌توان بیان نمود که جایگزینی آرد گندم با محصولات فاقد گلوتهی و عدم تشکیل شبکه گلوتهی می‌تواند باعث ایجاد خمیر با الاستیسیته گسترش‌پذیری کمتری شود (Sadeghi et al., 2015). در این راستا Moradi و Nasehi (۲۰۱۷) در تأثیر فیبر باگاس نیشکر بر ویژگی‌های خمیر و نان بربری گزارش کردند که کشش‌پذیری خمیر با افزودن سطوح مختلف فیبر

باگاس نیشکر و صمغ زانتان در زمان‌های تخمیر کاهش پیدا می‌کند (Moradi and Nasehi, 2017). مطابق با نتایج بیشترین زمان پایداری خمیر و انرژی پخت متعلق به تیمار شاهد و با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، میزان زمان پایداری خمیر و انرژی پخت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0.05$). Guarda و همکاران (۲۰۰۴) بیان نمودند که افزایش صمغ‌های کاراجینان و زانتان باعث کاهش ثبات و پایداری خمیر می‌گردد (Guarda et al., 2004). Barzegar و همکاران (۲۰۰۹) اثر برخی هیدروکلوئیدها بر خواص رئولوژیک خمیر و بیاتی نان باگت را بررسی کرده و گزارش نمودند مقاومت اولیه در برابر کشش نمونه‌ها با افزودن هیدروکلوئیدهای، به جز زانتان کاهش پیدا کرد که در این بین، پکتین دارای بیشترین کاهش در این فاکتور بود. افزودن هیدروکلوئیدهای گوار و پکتین باعث افزایش قابلیت کشش نمونه‌ها شدند و با اینکه افزودن گوار در حد ۰/۵ درصد باعث ایجاد بیشترین میزان الاستیسیته شد. همچنین انرژی مورد نیاز برای تغییر حالت در مورد نمونه‌های حاوی پکتین و ۱ درصد گوار، کاهش و مورد بقیه نمونه‌ها افزایش یافت که بیشترین میزان مربوط به نمونه ۰/۵ درصد گوار بود (Barzegar et al., 2009). نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌های Kohajdová و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی افزودن آرد نخود به کراکر دریافتند که پایداری خمیرهای حاوی آرد نخود کاهش یافته است که آن را به تداخلات به‌وجود آمده بین پروتئین‌های غیرگندمی و فیبرها با گلوتهی و واکنش‌های پروتئولیتیکی که منجر به تخریب نسبی شبکه پروتئینی و کاهش زمان مخلوط کردن می‌گردند نسبت دادند (Kohajdová et al., 2013).

جدول ۳- بررسی خواص رئولوژیکی خمیر نان باگت حاوی غلظت‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم و شاهد
Table 3- Investigating the rheological properties of baguette dough containing different concentrations of *Ganoderma lucidum* mushroom and control

نمونه Treatm ent	انرژی پخت Cooking energy (W) (10-4J)	زمان پایداری خمیر Dough Stability Time (TOL) (S)	الاستیسیته Elasticity (le) (%)	ضریب ایندکس Index coefficient (P/L)	کشش‌پذیری خمیر Dough stretchability (G)	طول کشیده شدن خمیر Dough elongation (mm)	مقاومت خمیر Dough resistance (P)
T ₁	196.0± 1.00 ^a	345.33± 1.53 ^b	45.83± 0.76 ^a	2.49± 0.09 ^a	18.20± 0.10 ^a	67.00± 1.00 ^a	101.00± 1.00 ^a
T ₂	123.0± 1.00 ^b	363.00± 1.00 ^a	30.13± 0.80 ^b	2.15± 0.03 ^b	16.90± 0.10 ^b	58.00± 1.00 ^b	87.00± 1.00 ^b
T ₃	82.0± 4.36 ^c	361.33± 1.53 ^a	22.16± 1.02 ^c	1.92± 0.01 ^c	16.20± 0.10 ^c	54.00± 1.00 ^c	79.00± 1.00 ^c
T ₄	79.0± 1.00 ^c	340.33± 1.53 ^c	9.53± 0.40 ^d	1.37± 0.01 ^d	15.96± 0.49 ^c	52.00± 1.00 ^c	75.00± 1.00 ^c
T ₅	79.0± 1.00 ^c	295.67± 2.08 ^d	7.70± 0.10 ^e	1.25± 0.01 ^e	14.00± 0.10 ^d	40.00± 1.00 ^d	67.33± 4.93 ^d
T ₆	72.3± 1.53 ^d	297.67± 2.08 ^d	5.80± 0.10 ^f	1.10± 0.01 ^f	12.40± 0.10 ^e	31.67± 1.528 ^e	52.33± 2.08 ^e

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. ^{a-f} حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

The results are shown as mean ± standard deviation. ^{a-f} Lowercase letters indicate significant difference in column.

بافت‌سنجی نان باگت

تغییرات ویژگی‌های بافت نمونه‌های نان حاوی درصدهای مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم در جدول ۴ نشان داده شده است. مطابق با نتایج

با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، شاخص‌های پیوستگی، فنریته، صمغیت، قابلیت جویدن و سختی نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش و شاخص چسبندگی به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند ($p \leq 0.05$).

گلوکوزید باعث تبدیل آمیلوپکتین به آمیلاز گردد (Kudanga et al., 2011). بنابراین نسبت آمیلاز به آمیلوپکتین در نان افزایش می‌یابد که در ارتباط مستقیم با سختی و قابلیت جویدن در نمونه‌های نان است. به مقاومت درونی ماده غذایی پیوستگی گفته می‌شود و میزان آن به بر هم کنش درون مولکولی اجزای فرمول بستگی دارد (Mojavarian et al., 2018) و دلیل کاهش آن می‌تواند به دلیل وجود رطوبت بیشتر در نمونه‌های حاوی قارچ گانودرما لوسیدوم باشد. فنریت توانایی نمونه برای بازگشت به شکل اولیه بعد از حذف نیروی تغییر شکل دهنده است که در منحنی پروفایل بافت معادل مسافتی است که ماده غذایی طی زمان، ارتفاع اولیه خود را بازیابی می‌کند (Khazee pool et al., 2014) و دلیل کاهش آن می‌تواند به دلیل وجود فیبر در قارچ گانودرما لوسیدوم و افزایش رطوبت در نمونه‌های حاوی قارچ گانودرما لوسیدوم باشد.

اتصالات عرضی پروتئین می‌تواند باعث تخریب شبکه گلوتن و در نتیجه آزاد شدن گرانول‌های کوچک نشاسته در شبکه شود. گرانول‌های کوچک نشاسته هنگام ارتباط با آنزیم‌ها در خمیر منجر به گسترش گرانول‌های نشاسته مثل آمیلوپکتین می‌شود که تقریباً ۶۵ تا ۸۱ درصد نشاسته را تشکیل می‌دهد. گرانول‌های کوچک نشاسته که در شبکه آزاد شده‌اند متراکم بوده و به آسانی هیدرولیز نمی‌شوند در حالی که گرانول‌های بزرگ‌تر به دلیل داشتن ساختار ضعیف‌تر جهت هضم شدن مناسب‌تر هستند (Nakamura, 2002). اصلی‌ترین جز آرد، نشاسته است که نقش مهمی در تعیین کیفیت نان دارد. آمیلوپکتین و آمیلاز از اجزای اصلی نشاسته هستند. نتایج تحقیقات نشان داده است افزودن قارچ گانودرما لوسیدوم به نمونه‌ها باعث افزایش آنزیم آمیلاز در محصول شده است. همچنین تحقیقات نشان داده است گانودرما لوسیدوم حاوی ایزوآمیلاز است که می‌تواند با تبدیل باند α -۱ و α -۶

جدول ۴- بررسی ویژگیهای بافت نان باگت حاوی غلظت‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم و شاهد

Table 4- Investigating the texture properties of baguette bread containing different concentrations of *Ganoderma lucidum* mushroom and control

نمونه Treatment	سختی (N) Hardness	چسبندگی (mj) Adhesiveness	قابلیت جویدن Chewiness	صمغیت Gumminess	فنریت Springiness	پیوستگی Cohesiveness
T ₁	5.52± 0.59 ^a	0.09± 0.00 ^d	44.20± 2.59 ^a	2.91± 0.04 ^a	18.91± 0.45 ^a	0.83± 0.05 ^a
T ₂	5.12± 0.47 ^a	0.11± 0.01 ^d	37.40± 1.30 ^b	2.68± 0.18 ^b	16.87± 0.48 ^b	0.78± 0.03 ^a
T ₃	3.58± 0.20 ^b	0.15± 0.01 ^c	26.47± 0.90 ^c	2.17± 0.14 ^c	14.51± 1.17 ^c	0.64± 0.03 ^b
T ₄	3.15± 0.52 ^b	0.18± 0.01 ^b	25.60± 2.82 ^c	1.94± 0.20 ^c	13.10± 0.52 ^{cd}	0.62± 0.04 ^b
T ₅	1.64± 0.08 ^c	0.21± 0.01 ^a	14.13± 0.42 ^d	1.09± 0.06 ^d	11.69± 0.79 ^d	0.59± 0.01 ^{bc}
T ₆	0.59± 0.07 ^d	0.28± 0.00 ^a	9.09± 0.85 ^e	0.51± 0.04 ^e	8.53± 0.28 ^e	0.49± 0.03 ^c

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. ^{a-e} حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

The results are shown as mean ± standard deviation. ^{a-e} Lowercase letters indicate significant difference in column.

همکاران (۲۰۰۵)، نشان داد کربوکسی متیل سلولز و صمغ عربی منجر به بهبود ویژگی‌های داخلی و خارجی نان و کاهش سفتی آن و بهبود و کاهش قابلیت جویدن گردید (Asghar et al., 2005).

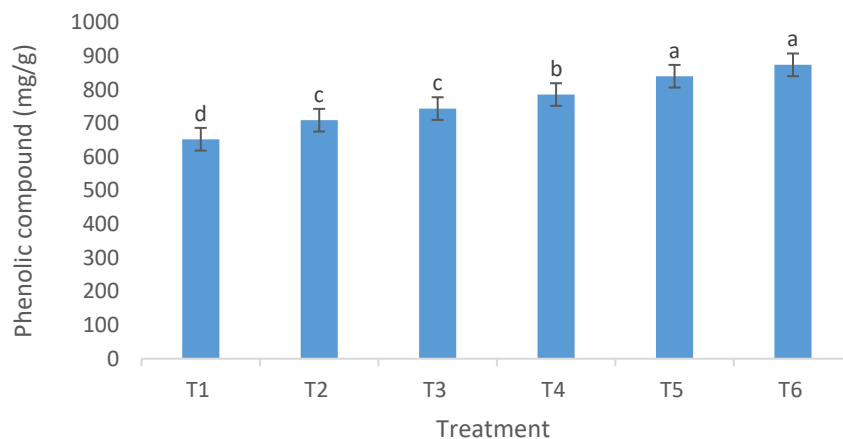
چسبندگی کار مورد نیاز جهت غلبه بر نیروی جاذبه بین سطح ماده با سطح سایر مواد در تماس با آن می‌باشد. در این تحقیق افزودن قارچ گانودرما لوسیدوم و افزایش غلظت آن باعث افزایش معنی‌دار چسبندگی در نمونه‌ها شد و علت آن می‌تواند مربوط به افزایش میزان فیبر و جذب آب بیشتر نمونه‌های نان باگت باشد (Khazee pool et al., 2014). Kaur و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی تاثیر صمغ‌های گوار و زانتان بر ویژگی کیفی پاستا اذعان نمودند که افزودن هر دو نوع صمغ، منجر به افزایش چسبندگی نمونه‌ها شده است (Kaur et al., 2015).

مقاومت ماده غذایی نسبت به اعمال نیروی فشار به کار گرفته شده در ماده غذایی سختی نامیده می‌شود (Szczesniak, 2002) و کاهش

به میزان تراکم ماده غذایی صمغیت گفته می‌شود. که در برابر جویدگی مقاومت نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر وجود فیبر در قارچ گانودرما لوسیدوم باعث افزایش رطوبت در نمونه‌ها و در نتیجه کاهش صمغیت در نمونه‌ها شد (Mojavarian et al., 2018). در این راستا Koocheki و همکاران (۲۰۱۲) اثر صمغ‌های دانه قدومه شیرازی و گزانتان بر خواص رئولوژیکی خمیر و کیفیت نان حاصل از گندم را بررسی و گزارش نمودند افزایش غلظت هیدروکلوئیدها باعث کاهش میزان صمغیت مغز نان گردید (Koocheki et al., 2012).

قابلیت جویدن، کار لازم برای جویدن و خمیر کردن نمونه برای بلع می‌باشد (Khazee pool et al., 2014). قابلیت جویدن با سختی نمونه‌ها رابطه مستقیم دارد و از طرفی با توجه به کاهش سختی نمونه‌های حاوی قارچ گانودرما لوسیدوم در این تحقیق به دلیل رطوبت بیشتر در نمونه‌ها، قابلیت جویدن کاهش یافت. یافته‌های Asghar و

یافت. [Malakoot Tabari](#) و همکاران (۲۰۱۲) اثر حلال‌های مختلف بر ترکیبات فیتوشیمیایی ۲ گونه قارچ گانودرما را بررسی کردند. نتایج نشان داد مقدار ترکیبات فنلی در عصاره متانولی گانودرما آیلاناتوم بیشتر از گانودرما لوسیدوم و در عصاره اتانولی فنل کل در گانودرما لوسیدوم بیشتر بود ([Malakoot Tabari et al., 2012](#)). [Cor](#) و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند قارچ گانودرما لوسیدوم حاوی ترکیبات زیست فعال نظیر کربوهیدرات‌ها، گلیکوزیدها، تری‌ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی و تانن‌ها می‌باشد ([Cor et al., 2018](#)). [Kamali](#) و همکاران (۲۰۱۴) نیز به بررسی ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، آنتوسیانینی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف اندام هوایی گیاه دارویی زین گیاه^۱ پرداختند. نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالاتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر عصاره‌ها حاصل شد و از طرفی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نقش عمده و مستقیمی بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر عهده دارند که این امر مطالعات بیشتری جهت جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی این گیاه می‌طلبد ([Kamali et al., 2014](#)). [Moore](#) و همکاران (۲۰۰۶) محتوای فنل کل ۲۰ گونه مختلف گندم را اندازه‌گیری کرده و گزارش نمودند که محتوای فنل کل در محدوده ۲۷۰۰ تا ۳۷۰۰ µg GAE/g بود ([Moore et al., 2006](#)). [Yu](#) و همکاران (۲۰۰۳) محتوای فنولیک آرد گندم را از ۱۷۷ تا ۲۵۷ µg GAE/g گزارش کردند ([Yu et al., 2003](#)).



شکل ۱- بررسی ترکیبات فنلی (mg/g) نان باگت حاوی درصد‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم و نمونه شاهد

Fig. 1. Investigation of phenolic compounds (mg/g) of baguette bread containing different percentages of *Ganoderma lucidum* mushroom and the control

مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، در فرمولاسیون نان باگت مقدار فیبر نمونه‌های نان به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت ($p \leq 0.05$). تحقیقات نشان داده است قارچ‌ها حاوی ۳-۳۲ درصد فیبر

سختی بافت در نتیجه افزایش قارچ گانودرما لوسیدوم می‌تواند به دلیل وجود فیبر در نمونه‌های حاوی قارچ گانودرما لوسیدوم باشد که منجر به جذب آب بیشتر و کاهش سختی نمونه‌ها شود. [Sadeghizadeh](#) و همکاران (۲۰۱۷) خصوصیات تکنولوژیکی و تصویری کیک اسفنجی حاوی آرد کنجاله کنجد و آناناس را بررسی کردند. و گزارش نمودند افزایش مقدار کنجاله کنجد نسبت به نمونه شاهد دارای سفتی بافت بیشتری بود ([Sadeghizadeh et al., 2017](#)). [Kaur](#) و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی تاثیر صمغ‌های گوار و زانتان بر ویژگی کیفی پاستا اذعان نمودند که افزودن هر دو نوع صمغ، منجر به کاهش سفتی نمونه‌ها شده است. که علت این امر به تاخیر در تورم گرانول‌ها و همچنین تعامل و ارتباط کمتر آنها در حضور صمغ‌ها نسبت داده شد ([Kaur et al., 2015](#)).

ترکیبات فنلی نان

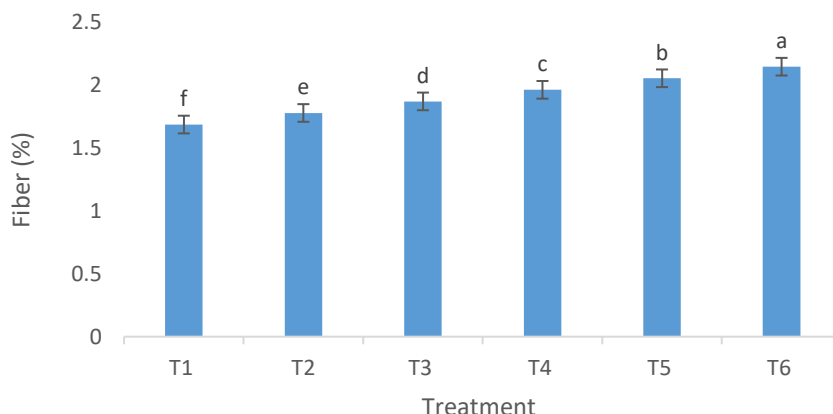
تغییرات ترکیبات فنلی نمونه‌های نان حاوی درصد‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم در شکل ۱ نشان داده شده است. مطابق با نتایج با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، ترکیبات فنلی نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.05$). تحقیقات نشان داده است قارچ گانودرما لوسیدوم حاوی ترکیبات فنلی از جمله پروتوکاتچین اسید، هیدروکسی بنزوئیک اسید است ([Szczesniak, 2002](#)). بنابراین با افزایش مقادیر قارچ گانودرما لوسیدوم مقدار ترکیبات فنلی افزایش

فیبر نان باگت

تغییرات فیبر نمونه‌های نان حاوی درصد‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم در شکل ۲ نشان داده شده است. مطابق با نتایج با افزایش

¹*Dracocephalum Kotschy*

2001). در پژوهشی دیگر Man و Păucean (۲۰۱۴) طی تحقیقی نشان دادند با افزایش پالپ کدو (۱۵ تا ۵۰ درصد) به جای آرد گندم در فرمولاسیون نان، فیبر نان تولیدی افزایش یافت (Păucean and Man, 2014).



شکل ۲- بررسی فیبر نان باگت حاوی غلظت‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم و شاهد

Fig. 2. Investigation of fiber (%) of baguette bread containing different percentages of *Ganoderma lucidum* mushroom and the control

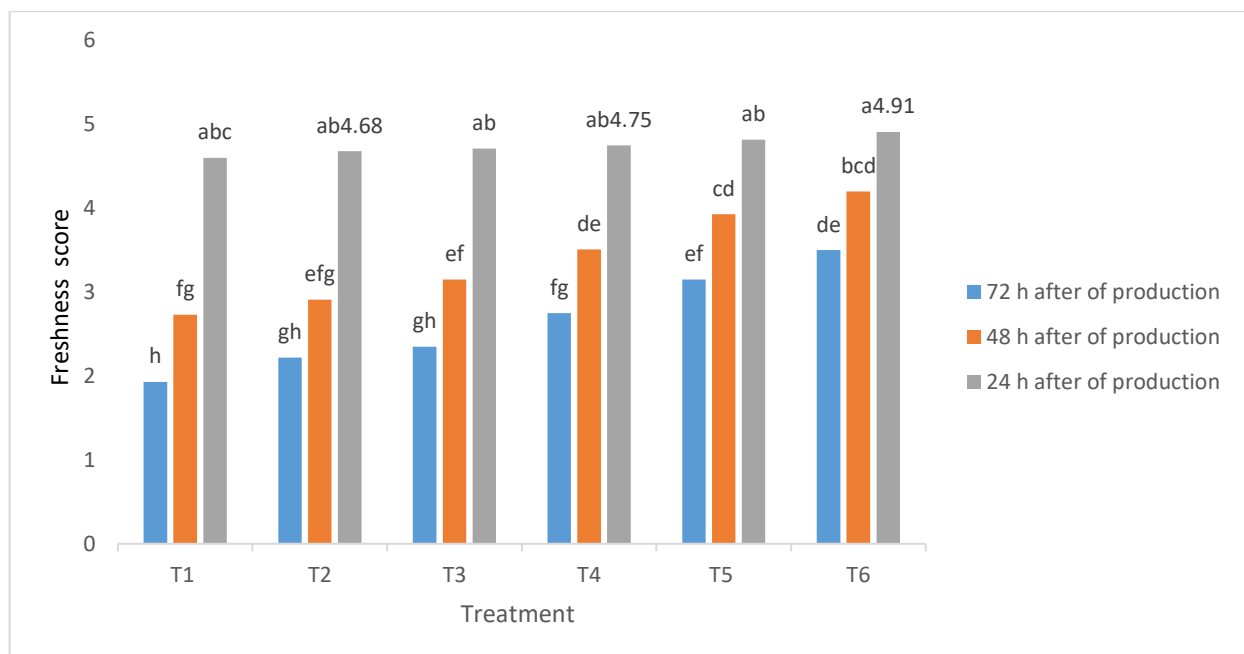
کاهش میزان بیاتی نان‌های حاوی مقادیر ۲/۵ درصد از قارچ گانودرما لوسیدوم، نسبت به نمونه شاهد را چنین می‌توان تفسیر نمود که ترکیبات فیبری آن با جذب متناسب آب مانع از خروج رطوبت که یکی از عوامل موثر در بیاتی و سفتی نان است، می‌شوند. همچنین این ترکیبات قادرند با مولکول‌های نشاسته واکنش دهند و فرایند رتروگراداسیون را در محصول نهایی به تعویق اندازند (Nikoozade et al., 2011). همچنین مطابق با نتایج این تحقیق قارچ گانودرما لوسیدوم جایگزین آرد مصرفی شد و با توجه به تحقیقات انجام شده قارچ گانودرما لوسیدوم حاوی آنزیم آلفاآمیلاز است (Guowei et al., 2019) و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز مخصوصا در نان‌های حجیم اهمیت بسیار زیادی دارد که باعث کاهش بیاتی و حفظ تازگی نان می‌شود. Kohajdová و همکاران (۲۰۰۹) طی تحقیقی نشان دادند علت کاهش نرمی بافت در میزان بالای بتاگلوکان می‌تواند به علت تقویت شبکه اسفنجی موجود در کیک باشد (Kohajdová et al., 2009). در پژوهش دیگری Shafi Soltani و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر آنزیم آلفاآمیلاز را بر کیفیت خمیر و نان تست و بیاتی نمونه‌های نان را بررسی کردند و گزارش کردند یکی عوامل موثر بر سفتی و بیاتی نان آنزیم آلفاآمیلاز بوده و به نحوی که افزودن آنزیم آلفاآمیلاز سبب به تعویق انداختن بیاتی نان شده است (Shafi Soltani et al., 2013).

هستند. بنابراین افزایش مقدار این قارچ در تیمارهای تحقیق می‌تواند باعث افزایش فیبر در نمونه‌ها شود (Wachtel-Galor et al., 2011). در تأیید نتایج حاصل از این تحقیق Mau و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند گانودرما لوسیدوم حاوی ۵۹ درصد فیبر می‌باشد (Mau et al., 2001).

ارزیابی میزان بیاتی نان باگت (روش حسی)

میزان بیاتی نان (بیشترین حس تازگی = ۵ و کمترین حس تازگی = ۱) نمونه‌های نان حاوی درصد‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم در شکل ۳ نشان داده شده است. مطابق با نتایج با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، مقدار تازگی نمونه‌های نان افزایش یافت. در بازه زمانی ۲۴ ساعت پس از پخت، نان حاوی ۲ و ۲/۵ درصد قارچ گانودرما لوسیدوم، نرمترین بافت و کمترین میزان بیاتی را نسبت به نمونه شاهد دارا بودند. همچنین پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از پخت، نمونه حاوی ۲/۵ درصد قارچ گانودرما لوسیدوم به‌طور معنی‌داری تازه‌تر از نمونه شاهد بود ($p \leq 0.05$).

بیات شدن نان فرایند فیزیکوشیمیایی پیچیده‌ای است که نتیجه ظاهری و نامطلوب آن، سفت شدن مغز و لاستیکی شدن پوسته نان می‌باشد. بیاتی حاکی از تغییر در ظاهر، طعم، مزه و بافت نان و در نهایت کاهش پذیرش آن توسط مصرف‌کننده است. مکانیسم‌های فیزیکوشیمیایی که در این پدیده دخالت دارند هنوز به درستی مشخص نشده‌اند ولی فرایند واگستگی نشاسته، مهاجرت آب و برخی تغییرات در گلوتن در بیاتی نان نقش مهمی دارند. واگستگی نشاسته یک فرایند پیچیده است که در آن زنجیره‌های آمیلوز و آمیلوپکتین که در اثر ژلاتینه شدن محلول شده‌اند، در اثر سرد شدن تجمع پیدا کرده و ساختار سه بعدی کریستالی تشکیل می‌دهند (Nasehi et al., 2015).



شکل ۳- بررسی میزان بیاتی نان باگت (امتیاز تازگی) حاوی غلظت‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم و شاهد طی ۷۲ ساعت نگهداری
Fig. 3. Investigation of the staleness (freshness score) of baguette bread containing different percentages of *Ganoderma lucidum* mushroom and the control in 72h storage

نتایج میکروبی

تغییرات نتایج میکروبی نمونه‌های نان حاوی درصدهای مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم در جدول ۵ نشان داده شده است. مطابق با نتایج با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدوم، تعداد کلی‌فرم‌ها و کپک به شکل معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0.05$). به عبارت دیگر ویژگی‌های میکروبی با تغییر سطح قارچ گانودرما لوسیدوم، تغییر کرده‌اند. جدول ۵

جدول ۵- بررسی نتایج میکروبی نان باگت حاوی غلظت‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدوم و شاهد

Table 5- Investigating the microbial results of baguette bread containing different concentrations of *Ganoderma lucidum* mushroom and control

نمونه Treatm ent	کپک Mold (cfu/g)	کلی‌فرم Coliform (cfu/g)
T ₁	440.33± 9.07 ^a	9.00± 1.000 ^a
T ₂	391.67± 7.64 ^b	7.00± 1.000 ^{ab}
T ₃	300.00± 9.17 ^c	6.33± 0.577 ^{bc}
T ₄	253.00± 6.24 ^d	4.33± 0.577 ^{cd}
T ₅	144.00± 5.57 ^e	2.33± 0.577 ^{de}
T ₆	110.00± 9.17 ^f	1.67± 0.577 ^e

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. ^{a-f}حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هرستون می‌باشد.

The results are shown as mean ± standard deviation. ^{a-f} Lowercase letters indicate significant difference in column.

می‌تواند به ترکیبات زیست فعال آن نظیر کربوهیدرات‌ها، گلیکوزیدها، تری‌ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی و تانن‌ها مربوط باشد (Cor et al., 2018). در مطالعه‌ای که Celal (۲۰۱۹) انجام داد خواص

Cor و همکاران (۲۰۱۸) در یک تحقیق مروری نشان دادند هنوز مکانیسم فعالیت ضدویروسی و ضد میکروبی قارچ گانودرما لوسیدوم به‌طور دقیق مشخص نیست و خاصیت ضد میکروبی قارچ مذکور

افزایش جایگزینی در تیمارهای بیشتر از ۱/۵ درصد قارچ گانودرما لوسیدیوم، امتیاز ارزیابی بافت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. می‌توان علت آن را مداخله مولکول‌های چربی و پروتئین موجود در گانودرما دانست که مقادیر بالای پروتئین سبب ایجاد اتصالات متقاطع در سیستم و در نهایت ساختار سفت‌تر و متراکم‌تر می‌گردد (Mortazavinezhad et al., 2016). همچنین با افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدیوم، امتیازات ارزیابی حسی، مزه و پذیرش کلی در تیمارهای بیشتر از ۱/۵ درصد قارچ گانودرما لوسیدیوم کاهش جزئی یافت همچنین امتیازات اختصاص یافته از نظر ارزیاب‌ها در تمامی تیمارهای تحقیق بیشتر از ۴ بود که بیانگر مطلوب بودن تمامی تیمارهای تحقیق می‌باشد. همچنین می‌توان اظهار نمود که استفاده از گانودرما لوسیدیوم به‌عنوان یک ترکیب عملگر اثر نامطلوبی بر خصوصیات حسی محصول نهایی نداشت. Hegazy و Ibrahim (۲۰۱۴) اثر جایگزینی آرد گندم با پودر قارچ و آرد سیب‌زمینی شیرین بر ترکیبات تغذیه‌ای و ویژگی‌های حسی بیسکویت را بررسی کردند. نتایج نشان نمونه‌های حاوی ۱۰ و ۲۰ درصد پودر قارچ و آرد سیب زمینی شیرین از نظر حسی امتیاز بالاتری را به خود اختصاص دادند (Hegazy and Ibrahim, 2014). Zhao و همکاران (۲۰۱۹) تأثیر نوعی داروی تخمیری حاوی قارچ گانودرما لوسیدیوم بر نوعی نان بخارپز چینی را بررسی کردند. نتایج ارزیابی حسی نشان داد استفاده از قارچ گانودرما لوسیدیوم دارای اثرات مثبتی بر شاخص‌های حجم نان، بو، ساختار هسته و پوسته، رنگ و طعم نان چینی داشت. همچنین رنگ نمونه‌ها نسبت به نمونه کنترل تیره‌تر شد (Zhao et al., 2019).

آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قارچ گانودرما لوسیدیوم را بر ۹ گونه متفاوت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی کردند. قارچ گانودرما لوسیدیوم یک ضد میکروب طبیعی بوده که در برابر تمامی باکتری‌ها خاصیت ضد میکروبی داشت (Celal, 2019). مطابق با استاندارد ملی ایران، حدود مجاز میزان کپک و مخمر نان ۱۰^۳ و کلی‌فرم ۱۰^۲ می‌باشد که با افزایش میزان قارچ گانودرما لوسیدیوم، میزان کپک و مخمر و کلی‌فرم کاهش و در محدوده استاندارد ملی قرار داشتند.

ارزیابی حسی

تغییرات ارزیابی حسی نمونه‌های نان حاوی درصدهای مختلف قارچ گانودرما لوسیدیوم در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج ارزیابی حسی رنگ نشان داد افزایش مقدار قارچ گانودرما لوسیدیوم، بر خصوصیات حسی رنگ معنی‌دار بوده و با افزایش میزان قارچ گانودرما لوسیدیوم، امتیاز رنگ کاهش یافت ($p \leq 0.05$). که علت آن می‌تواند میزان پروتئین موجود در قارچ گانودرما لوسیدیوم، باشد که عامل تشدید واکنش میلارد در محصول است (Nateghi, 2017). با توجه به نتایج درصدهای مختلف قارچ گانودرما لوسیدیوم، تأثیر معنی‌داری بر روی امتیاز بو نان نداشت.

بافت مواد غذایی به‌عنوان یکی از مهمترین خصوصیات کیفی محصول، نقش مهمی در پذیرش کلی آن توسط مصرف‌کنندگان دارد. سختی بافت، بیانگر مقاومت ماده غذایی نسبت به اعمال نیروی فشاری است، و تا حدود زیادی به میزان رطوبت و تحرک آب، ماده خشک، میزان پروتئین و چربی محصول وابسته است. نتایج نشان داد که با

جدول ۶- بررسی ارزیابی حسی نان باگت حاوی غلظت‌های مختلف قارچ گانودرما لوسیدیوم و شاهد

Table 6- Investigating the sensory evaluation of baguette bread containing different concentrations of *Ganoderma lucidum* mushroom and control

نمونه Treatment	بو Smell	مزه Taste	بافت Texture	رنگ Color	پذیرش کلی General acceptance
T ₁	4.80 ± 0.11 ^a	4.90 ± 0.06 ^a	4.98 ± 0.02 ^a	4.52 ± 0.19 ^{ab}	4.85 ± 0.13 ^a
T ₂	4.85 ± 0.11 ^a	4.93 ± 0.04 ^a	4.92 ± 0.05 ^a	4.65 ± 0.16 ^{ab}	4.93 ± 0.05 ^a
T ₃	4.81 ± 0.13 ^a	4.80 ± 0.15 ^a	4.81 ± 0.15 ^a	4.76 ± 0.22 ^{ab}	4.90 ± 0.06 ^a
T ₄	4.75 ± 0.12 ^a	4.72 ± 0.24 ^a	4.75 ± 0.19 ^{ab}	4.80 ± 0.11 ^a	4.75 ± 0.19 ^a
T ₅	4.72 ± 0.17 ^a	4.60 ± 0.18 ^{ab}	4.30 ± 0.23 ^{bc}	4.48 ± 0.32 ^{ab}	4.58 ± 0.31 ^{ab}
T ₆	4.60 ± 0.14 ^a	4.11 ± 0.31 ^b	4.06 ± 0.28 ^c	4.12 ± 0.34 ^b	4.20 ± 0.27 ^b

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. ^{a-d} حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

The results are shown as mean ± standard deviation. ^{a-d} Lowercase letters indicate significant difference in column.

نان، خواص میکروبی و حسی انجام گردید. مطابق با نتایج اثر جایگزینی درصدهای مختلف قارچ گانودرما لوسیدیوم، بر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی (خاکستر، فیبر و اسیدیته و pH) معنی‌دار بود. نتایج بررسی خواص رئولوژیکی نشان داد که افزایش میزان قارچ گانودرما

نتیجه‌گیری

این تحقیق با هدف غنی‌سازی نان باگت با استفاده از قارچ گانودرما لوسیدیوم (با درصدهای ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵) و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، خواص رئولوژیکی، بافت‌سنجی، ترکیبات فنلی، بیاتی

نمونه شاهد پس از ۷۲ ساعت نگهداری بود. بررسی نتایج خواص میکروبی نشان داد که قارچ گانودرما لوسیدوم سبب کنترل فعالیت کلی فرم‌ها، کپک و مخمر در نان‌ها طی مدت نگهداری شده است بنابراین دارای خاصیت ضد میکروبی و کپکی است. به‌طور کلی، با توجه به نتایج به‌دست آمده، نمونه نان‌ها حاوی ۲/۵ درصد قارچ گانودرما لوسیدوم به جای آرد گندم، به دلیل خواص بافتی و حسی بهتری که نسبت به نمونه شاهد به‌دست می‌آورد و به‌طور کلی استفاده از قارچ گانودرما لوسیدوم به‌عنوان یک افزودنی طبیعی و یک ترکیب غنی‌کننده در تولید سایر محصولات نانوائی نظیر نان سنگک، بربری و نان تست پیشنهاد می‌شود.

لوسیدوم، به‌گونه‌ای موجب کاهش خصوصیات رئولوژیکی (مقاومت خمیر، طول کشیده شدن خمیر، کشش‌پذیری خمیر، ضریب ایندکس، الاستیسیته، زمان پایداری خمیر و انرژی پخت)، نان‌های حاصل شد که تیمار حاوی ۲/۵ درصد قارچ گانودرما لوسیدوم، بیشترین میزان کاهش را داشتند. همچنین نتایج بافت‌سنجی نشان داد که تیمار حاوی ۲/۵ درصد قارچ گانودرما لوسیدوم، از کمترین میزان پیوستگی، فنریته، صمغیت قابلیت جویدن و سختی و بیشترین میزان چسبندگی نسبت به تیمار شاهد و سایر نمونه‌ها برخوردار بودند. همچنین افزایش مقادیر قارچ گانودرما لوسیدوم، تا ۲/۵ درصد سبب افزایش ترکیبات فنلی و فیبر نمونه‌های نان باگت گردید. همچنین تیمار حاوی ۲/۵ درصد قارچ گانودرما لوسیدوم، از بین تیمارها دارای کمترین میزان بیانی نسبت به

منابع

1. AACC. (1995). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists (9th ed). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
2. AACC. (2010). International Approved Methods of the AACC. St. Paul, Minnesota, USA.
3. AOAC. (2000). ACC Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 32-05. Soluble, Insoluble, and Total Dietary Fiber in Foods and Food Products. A pproved 2000. Cereals & Grains Association, St. Paul, MN, U.S.A.
4. Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A., and Martín-Belloso, O. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control Journal*. 76. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.001>
5. Asghar, A., Anjum, F. M., Tariq, M. W., and Hussain, S. (2005). Effect of carboxymethylcellulose and gum Arabic on the stability of frozen dough for bakery products. *Turkish Journal Biology*. 29. 237-41.
6. Barzegar, H., Hojati, M., and Joyande, H. (2009). Effect of some hydrocolloids on rheological properties of baguette dough and stale. *Quarterly Journal of Food Science and Technology*. 6:3. 101-107. (In Persian)
7. Celal, B. (2019). Antioxidant and antimicrobial capacities of *Ganoderma lucidum*. *MedCrave*. 7(1): 5-7.
8. Chen, B., Ke, B., Ye, L., Jin, S., Jie, F., Zhao, L., and Wu, X. (2017). Isolation and varietal characterization of *Ganoderma resinaceum* from areas of *Ganoderma lucidum* production in China. *Scientia Horticulturae Journal*. 224. 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.002>
9. Cör, D., Knez, Ž., Knez Hrnič, M. (2018). Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: A Review *Molecules Journal*. 23:3. 649. <https://doi.org/10.3390/molecules23030649>
10. Ebadi Molabashi, M., and Nateghi, L. (2018). Investigation of the effect of watercress gum on improving the physicochemical and sensory properties of rice pastry. *Journal Innovation in Food Science and Technology*. 10:3. 129-149. (In Persian)
11. Funami, T. (2009). Functions of food polysaccharides to control the gelatinization and retrogradation behaviors of starch in an aqueous system in relation to the macromolecular characteristics of food polysaccharides. *Food science and technology research*, 15:6. 557-568.
12. Gani, S., Azizi, M. H., Ahmadi, H., and Aliari, P. (2014). Enrichment of bread with polyphenolic compounds and the effect of polyphenolic compounds on the physical properties of bread, 22nd National Congress of Food Sciences and Industries. Gorgan, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian)
13. Guarda, A., Rosell, C. M., Beditob C., and Galottoc, M. J. (2004). Different hydrocolloids as bread improvers & antistaling agents. *Food Hydrocolloid*. 18. 241-247. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00080-8)
14. Guowei, Z., Lili, W., Yufeng, L., and Hailei, W. (2019). Impact of the fermentation broth of *Ganoderma lucidum* on the quality of Chinese steamed bread. *AMB Express*. 9:1. 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0859-5>
15. Hesarinejad, M. A., Rezaian Attar, F., Mosaffa, O., Shokrollahi Yancheshmeh, B. (2017). The effect of incorporation of *Chlorella Vulgaris* into cake as an egg white substitute on physical and sensory properties. *Iranian Journal of Food Science and Technology*. 68:14. 61-72. (In Persian)
16. Ibrahim, M., and Hegazy, A. (2014). Effect of replacement of wheat flour with mushroom powder and sweet potato flour on nutritional composition and sensory characteristics of biscuits. *Current Science International*. 3:1. 26-33.
17. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2007). Microbiology of food and animal feed - a comprehensive method for the general enumeration of microorganisms. (ISIRI Standard No. 5272).

18. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2008). Cereals, legumes and by-products - Measuring ash in the furnace. (ISIRI Standard No. 2706).
19. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2009). Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique. (ISIRI Standard No. 9263).
20. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2010). Cereals and its products - Humidity measurement method - Reference method. (ISIRI Standard No. 2705).
21. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2018). Biscuits - Properties and Test Methods. (ISIRI Standard No. 37).
22. Jascanu, V., and Stefoane, E. D. (2006). The Influence of Clarase and Hemicellulase over the 650 Flour Type. *Seria of Chemistry Journal*. 9. 73-80.
23. Kamali, M., Khosroyar, S., and Jalilvand, M. R. (2014). Evaluation of phenolic, flavonoids, anthocyanin contents and antioxidant capacities of different extracts of aerial parts of *Dracocephalum kotschyi*. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*. 6:3. 627-634. (In Persian)
24. Kaur, A., Shevkani, Kh., Singh, N., Sharma, P. and Kaur, S. (2015). Effect of guar gum and xanthan gum on pasting and noodle-making properties of potato, corn and mung bean starches. *Journal of Food Science and Technology*, 52:12. 8113–8121. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1954-5>
25. Khazee pool, A., Shahidi, B., Mortazavi, A., and Mohebbi, M. (2014). Formulation of kiwi Gummy candy and effects of different concentrations of agar and guar on moisture content and texture and sensory properties. *Jornnal Iranian Food Science and Technology Researche*. 10:1. 27-37. (In Persian)
26. Kohajdová, Z., Karovičová, J. and Magala, M. (2013). Rheological and qualitative characteristics of pea flour incorporated cracker biscuits. *Croatian Journal of Food Science and Technology*. 5:1. 11-17.
27. Kohajdová, Z., Karovičová, J., and Schmidt, Š. (2009). Significance of emulsifiers and hydrocolloids in bakery industry. *Acta Chimica Slovaca*. 2:1. 46-61.
28. Koocheki, A., Shahidi, F., Mortazavi, S.A., Karimi, M., and Milani, L. (2012). Evaluation of the effect of Gum of Ghadomeh Shirazi (*Homolocarpum Alyssum*) and xanthan on rheological properties of dough and quality of bread made from wheat flour. *Iranian Journal of Food Science and Industry Research*. 7:1. 9-16. (In Persian)
29. Kudanga, T., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., and Burton, S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme and Microbial Technology J*. 48:3. 195-208. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.007>
30. Malakoot Tabari, S. H., Ghorbanli, M., Safaeian, S. H., and Musazadeh, S. A. (2012). The effect of different solvents on the phytochemical composition of two species of Ganoderma fungi. *First National Conference on Biological Sciences Falavarjan*. 10:1. 27-37. (In Persian)
31. Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Barreiro, F., and Ferreira, I. C. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & Function Journal*. 5:6. 1091-1100. <https://doi.org/10.1039/C3FO60721F>
32. Mau, J. L., Lin, H. C., and Chen, C. C. (2001). Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International Journal*. 34:6. 521-526. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00067-9)
33. Mojavarian S. P., Raftani Amiri Z., and Shahiri Tabarestani, H. (2018). Optimization of Ginger Pastil Formulation Based on Chicken Foot Gelatin and Grape Concentrate by Response Surface Method (RSM). *Journal Food Science and Technology*. 15:82. 319-334. (In Persian)
34. Moore, J., Liu, J.G., Zhou, K., Yu, L. (2006). Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 54:15. 5313. <https://doi.org/10.1021/jf060381l>
35. Moradi, F., and Nasehi, B. (2017). Investigation the Properties of Dough and Barbari Bread Enriched with Sugarcane Bagasse. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 3:6. 244-235. (In Persian)
36. Mortazavinezhad, S., Abbasi, H., Jahadi, M. (2016). Optimizing the components of the sponge cake containing acar. *Journal Research Innovation Food Science Technology*. 1:5. 1-14. (In Persian)
37. Nakamura, Y. (2002). Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant and Cell Physiology Journal*. 43:7. 718-725. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf091>
38. Nasehi, B., Azizi, M. H., Hadian, Z. (2009). Different approaches for determination of bread staling. *Journal of Food Science and Technology*. 6:1. 53-63.
39. Nasehi, B., Razavi, M. A., and Qudsi, M. (2015). Physicochemical, sensory and microbial properties of baguette bread containing Aloe Vera gel during storage. *Journal of Food Industry Research*. 25:2. 249-258. (In Persian)
40. Nasrabadi, M. S., and Nori Topkanloo, H. (2020). The effect of wheat flour replacement with *Eleaagnus angustifolia* powder on physicochemical and sensory properties of toast bread. *Food Engineering Research*. 19:68. 155-168. (In Persian)

41. Nateghi, L. (2017). The effect of carboxymethylcellulose hydrocolloid and diacetyl tartaric acid emulsifier on physicochemical, sensory and shelf life of toast enriched with pinto bean flour and chickpea. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 9:2. 42-59. (In Persian)
42. Nikoozade, H., Taslimi, A., Azizi, M. H. (2011). Effects of the addition of oat bran on the rheological characteristics of dough and quality of Sangak bread. *Journal of Food Science and Technology*. 8:1. 1-10. (In Persian)
43. Oludemi, T., Barros, L., Prieto, M. A., Heleno, S. A., Barreiro, M. F., and Ferreira, I. C. (2018). Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from *Ganoderma lucidum*: optimization study using the response surface methodology. *Food & Function Journal*. 9:1. 209-226. DOI: 10.1039/C7FO01601H
44. Păucean, A., and Man, S. (2014). Physico-chemical and sensory evaluations of wheat bread with pumpkin (*Cucurbita maxima*) pulp incorporated. *Agroaliment Proc Technology Journal*. 20:1. 26-32.
45. Peighambardoust, S. H., Azadmardmirchi, S., Fath Nejad Kazemi, R., Nemati, M., and Rafat, S. A. (2012). Application of flax in bread preparation: Effect on chemical properties, fat phase composition of flour and bread and sensory quality of fortified semi-bulk bread. *Journal of Food Industry Research*. 23:2. 281-292. (In Persian)
46. Rasti, S., Azizi, M.H. and Abbasi, S. (2011). Effects of barley β -glucan on some rheological properties of wheat flour. *Journal of Food Science and Technology of Iran*. 4:6. 58-51. (In Persian)
47. Sadeghi, A., Sadeghi, B., and Ebrahimi, M. (2015). Evaluation of shelf life and sensory properties of baguette bread enriched with sour dough of whole barley flour and pumpkin puree. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 9:1. 81-91. (In Persian)
48. Sadeghizadeh Dehkordi, A., Najafabadi, M. F., and Abbasi, H. (2017). Investigation of technological and visual characteristics of sponge cake containing sesame and pineapple meal flour and determination of the optimal level of these two nutrients. *Journal Iranian Food Science and Technology*. 14:69. 255-268. (In Persian)
49. Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Iotti, M., Zambonelli, A., Buffalini, M., Casadei, L., and Stocchi, V. (2009). Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry Journal*. 116:1. 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.023>
50. Shafi Soltani, M., Salehifar, M., Hashemi, M. (2013). Effect of alpha-amylase activity on dough and toast bread quality. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 6:2. 44-54. (In Persian)
51. Szczesniak, A. S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*. 13:4. 215-225. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00039-8)
52. Vaher, M., Matso, K., Levandi, T., Helmja, K., and Kaljurand, M. (2010). Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry*. 2. 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.12.013>
53. Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J. A., and Benzie, I. F. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. CRC Press/Taylor & Francis.
54. Whitehurst. R. J. and Oort. M. V. (2010). *Enzymes in Food Technology*. 2th edn, India: John Wiley Sons Publishing, PP 388.
55. Yasamani Farimani, T., Hesarinejad, M., Tat, M. (2020). A new study on the quality, physical and sensory characteristics of cupcakes with *Althaea officinalis* mucilage. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 16:3. 25-35.
56. Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M. (2003). Antioxidant properties of bran extracts from "Akron" wheat grown at different locations. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 51:6. 1566.
57. Zhao, G., Lili, W., Yufeng, L., and Hailei, W. (2019). Impact of the fermentation broth of *Ganoderma lucidum* on the quality of Chinese steamed bread. *AMB Express*. 9 (133). 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0859-5>



Evaluation of technological and functional properties of breakfast cereal based on flaxseed oil cake and broken rice flour

Alireza Abbasi¹, Arash Koocheki², Elnaz Milani^{3*}, Mohebbat Mohebbi²

Received: 2021.09.07

Revised: 2021.09.14

Accepted: 2021.09.15

Available Online: 2021.09.15

How to cite this article:

Abbasi, A., Koocheki, A., Milani, E., Mohebbi, M. (2022). Evaluation of technological and functional properties of breakfast cereal based on flaxseed oil cake and broken rice flour. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 631-647.

Abstract

Introduction: Breakfast cereal products are considered as an important meal for athletes and children. By changing eating habits and increasing the consumption of these products, choosing healthy and nutritious raw materials such as whole grains to produce breakfast cereals with great impact on people's health. Rice grain as a technologically important source of starch causes the expansion of extruded products. Since in the production of breakfast cereal and baby food products, exclusively starch with low amylose is used, this indicates the suitability of this source for production of such products. During the dehulling process, about 14% of the rice is broken to smaller grains, which is commercially classified as a low-value product. The broken rice can be converted to rice flour and used as a raw material in various types of food products. To maintain consumer demand for healthy diets, it is necessary to use high-fiber flours because these types of products will be able to modify the process of decomposition of starch. Although the integration of fiber in products has technological challenges, but by using rice grain as an important source of starch, the technological properties, expansion index, volumetric density and texture (texture hardness and brittleness) can be accepted. At present, modified starch derivatives are widely used in the food industry due to the increase in the quality of the final product. In the production of ready-to-use products for flaking, puffing, a process called extrusion is used. In this process, the product suddenly loses its moisture and leads to the creation of a dense structure containing pores. In this study, the effect of extrusion cooking process parameters on the desired characteristics of flax and rice meal breakfast cereal product with desirable physicochemical and sensory properties was investigated.

Materials and Methods: Extrusion: In this study, a parallel twin-screw extruder (Jinan Saxin, China) was applied, die diameter of 3 mm, and extrusion temperature of 140 °C. Central composite statistical design was used to study the effect of feed moisture (12, 15 and 18%), screw speed (140, 170 and 200 rpm) and Flaxseed oil cake addition (10, 20 and 30%) on technological and functional properties expanded extrudates. The chemical composition of flax meal and rice flour was measured by standard AACC (2000) methods. The expansion ratio was calculated by dividing the mean diameter (mm) by the diameter of the extruder die (4 mm) (Brennan et al, 2008). Textural measurement: The hardness of the extruded breakfast cereals was measured using Texture Analyzer (TA plus Ametek, UK). The cylinder steel probe (2 mm diameter) was set to move at a speed of 1 mm/s. The samples were punctured by the probe to a distance of 10 mm. Bowl life hardness: Breakfast cereal samples were immersed in whole milk (3% fat) at 5 °C for 3 minutes, Then rinsing was performed for 10 seconds and finally the samples were tested similar to the tissue hardness test procedure before immersion by a tissue analyzer (Oliveira et al, 2017). The color parameters L* (lightness), a*(redness), b*(yellowness) values of the samples were determined by the Hunterlab machine (Reston VA, US) (Rhee et al, 2004). Water absorption index in terms of grams of bonded water was calculated. The WSI of the dry solids regained through the evaporation of the supernatant obtained from the water absorption test was calculated (Alam et al, 2019). Sensory evaluation was

1 and 2. Former MSc Student and Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively.

3. Iranian Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi, Mashhad, Iran

(*Corresponding Author Email: e.milani@jdm.ac.ir)

DOI: [10.22067/ifstrj.2021.72341.1094](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.72341.1094)

performed using a 9-point hedonic test. Response surface methodology was applied for experimental data using a commercial statistical package, Design Expert (version 7.0) for the generation of response surface plot and statistical analysis of the experimental data.

Results and Discussion: One of the most important parameters in the evaluation of breakfast cereal products is the amount of bowl-life hardness, which in this study, the highest amount was obtained at the level of 30% of flaxseed meal, 18% moisture and the lowest amount of screw rotation speed. After immersing breakfast cereal in milk, by increasing the percentage of flax meal due to the harder flow path, moisture absorption decreases and thus prevents the expansion of the product and increases the density of the mass and the hardness of the tissue. Due to the formation of a layer of lipids and micelles on the surface of the product prevents moisture transfer and absorption, so tissue hardness decreases and bowl-life hardness time increases. In fact, the amount of moisture absorption is a good model that shows the potential of bowl hardness-life of the samples. It is also compact and dense, which increases the retention time of breakfast cereal texture. Moisture can also reduce the shear force as a plasticizer and increase the amount of moisture absorption of the product. While increasing the speed of screw rotation, the effect of shear force on starch dextrinization increases and reduces moisture absorption. Another important feature of breakfast cereals is the lightness index, the highest value of which was obtained at the speed of screw rotation, humidity and low flax meal level. In the study of sensory properties of products produced at meal levels less than 20%, moisture content less than 15% and screw speed of 200 rpm showed the highest overall acceptance.

Keywords: Extrusion, Rice flour, Breakfast cereal, Flaxseed oil cake.

مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های تکنولوژیکی و عملکردی غله صبحانه بر پایه کنجاله کتان و آرد برنج

علیرضا عباسی^۱ - آرش کوچکی^۲ - الناز میلانی^{۳*} - محبت محبی^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۴

چکیده

در راستای تغییر عادات غذایی مصرف فراورده‌های غله صبحانه به علت قابلیت مصرف راحت، مقرون به صرفه بودن و ارزش تغذیه‌ای بالا، دو چندان شده است. این فراورده‌ها لزوماً باید ساختاری فشرده و متراکم با تخلخل کم داشته باشند تا در هنگام غوطه‌وری در شیر به واسطه سرعت جذب آب آهسته فراورده سبب حفظ بافت و تردی آن گردد. ضروری است جهت دستیابی به بافت مطلوب و تعدیل تجزیه نشاسته از دانه‌های با فیبر رژیمی بالا و فرایند اکستروژن استفاده گردد. اگرچه ادغام فیبر در فراورده‌ها، چالش‌های تکنولوژیکی به همراه دارد اما با استفاده از دانه برنج به‌عنوان منبع مهم نشاسته و مالتودکسترین می‌توان به ویژگی‌های مورد نظر رسید. در این پژوهش با هدف دستیابی به فراورده غله صبحانه با خصوصیات فیزیکیوشیمیایی، عملکردی و حسی مطلوب، ارزیابی اثر متغیرهای فرایند اکستروژن شامل رطوبت (۱۲، ۱۵ و ۱۸ درصد)، سرعت ماریپیچ (۱۴۰، ۱۷۰ و ۲۰۰ دور بر دقیقه) و میزان کنجاله کتان (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) بر ویژگی‌های فراورده مورد نظر بر پایه آرد برنج با استفاده از طرح آماری سطح پاسخ بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش رطوبت منجر به افزایش سختی بافت، سختی بافت پس از غوطه‌وری در شیر، شاخص جذب آب و کاهش شاخص حلالیت در آب، شاخص قرمزی و شاخص زردی فراورده گردید. افزایش سرعت ماریپیچ سبب افزایش شاخص حلالیت در آب، شاخص قرمزی، شاخص زردی و کاهش نسبت انبساط، سختی بافت پس از غوطه‌وری در شیر، شاخص جذب آب و شاخص روشنایی رنگ شد. افزایش میزان کنجاله کتان باعث افزایش میزان سختی بافت پس از غوطه‌وری در شیر، شاخص قرمزی و کاهش نسبت انبساط، شاخص روشنایی، شاخص زردی، شاخص جذب آب گردید، شاخص حلالیت در آب ابتدا کاهش سپس افزایش یافت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد استفاده از کنجاله کتان تا سطح ۱۷ درصد به‌عنوان یک منبع غنی از فیبر رژیمی در فراورده‌های غله صبحانه اکستروژن شده می‌تواند سبب تولید فراورده‌ای با ویژگی‌های تکنولوژیکی و حسی مطلوب گردد.

واژه‌های کلیدی: اکستروژن، آرد برنج، غله صبحانه، کنجاله کتان.

مقدمه

دانه برنج (*Oryza sativa*) یکی از بیشترین محصولات توسعه یافته در جهان است و از لحاظ تکنولوژیکی به‌عنوان منبع مهم نشاسته سبب انبساط فراورده‌های اکستروژن شده می‌گردد (Santos et al., 2019; Walter et al., 2008). در طی فرایند پوست‌کنی حدود ۱۴ درصد از برنج بصورت دانه‌های شکسته خارج می‌شود که از لحاظ تجاری به‌عنوان محصول کم ارزش طبقه‌بندی می‌شوند که می‌تواند به آرد برنج تبدیل شده و به‌عنوان ماده خام در انواع مختلفی از فراورده های غذایی استفاده شود (Silva et al., 2008). معمولاً مقدار آمیلوز نشاسته انواع برنج حدود ۲۵-۱۵ درصد می‌باشد. در تولید غذای کودک و غله صبحانه منحصر از نشاسته با آمیلوز کم ۱۲-۲۰ درصد استفاده می‌شود که این نشان‌دهنده منبع مناسبی برای استفاده در فراورده‌های

غله صبحانه به‌عنوان اولین وعده غذایی روز با شیر یا آبمیوه مصرف می‌شوند و از دانه‌های غلاتی مانند ذرت، گندم، برنج، جو و جو دوسر تولید می‌شوند (Perdon et al., 2020). این فراورده‌های غذایی به دلیل راحتی مصرف، متنوع بودن در شکل، طعم و همچنین دارا بودن ارزش تغذیه‌ای بالا به عنوان یک وعده غذایی مهم برای ورزشکاران و کودکان به حساب می‌آیند (Santos et al., 2019). با توجه به تغییر عادات غذایی و افزایش مصرف فراورده‌های غله صبحانه انتخاب مواد اولیه سالم و مغذی مانند دانه‌های کامل برای تولید غله صبحانه تأثیر بسیار زیادی بر سلامت افراد می‌گذارد (Yaman et al., 2019).

* نویسنده مسئول: Email: e.milani@jdm.ac.ir

DOI: [10.22067/iftstrj.2021.72341.1094](https://doi.org/10.22067/iftstrj.2021.72341.1094)

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۳- دانشیار، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد.

از نظر تغذیه‌ای غلات صبحانه فراورده‌هایی با اندیس گلیسمی بالا هستند. این شاخص به‌طور گسترده مرتبط با تعدادی از بیماری‌ها از جمله دیابت، پیش دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان و چاقی است به همین دلیل سبب افزایش نگرانی در بازار مصرف غله صبحانه شده است و از آن جایی که تقاضای مصرف کننده برای محصولات غذایی سالم‌تر است، بنابراین جهت تامین سلامت و نیازهای تغذیه‌ای مصرف کننده ضروری است از آردهای با فیبر بالا استفاده شود به علت اینکه این نوع فراورده‌ها قادر به تعدیل فرایند تجزیه نشاسته خواهند بود (Brennan et al, 2012). اگرچه ادغام فیبر در فراورده‌های صنایع غذایی چالش‌های تکنولوژیکی به همراه دارد اما با استفاده از دانه برنج به‌عنوان منبع مهم نشاسته می‌توان به ویژگی‌های تکنولوژیکی، شاخص انبساط، دانسیته حجمی و بافت (سختی بافت و تردی) مورد پذیرش رسید (Santos et al, 2019; Oliveira et al, 2018). در مطالعات پیشین استفاده از انواع دانه‌های غلات در تولید فراورده‌های غله صبحانه و ارزیابی اثر پارامترهای اکستروژن بررسی شده است اما استفاده از کنجاله کتان به همراه برنج در تولید این فراورده‌ها بررسی نشده است. بنابراین، در این تحقیق برآن شدیم با استفاده از کنجاله کتان و برنج در ضمن تولید فراورده غله صبحانه با خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی و حسی مطلوب، اثر پارامترهای فرایند پخت اکستروژن بر ویژگی‌های مورد نظر بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

دانه روغنی کتان از عطاری سطح شهر، دانه برنج شکسته ایرانی واریته هاشمی از فروشگاه و پودر مالتودکسترین (میزان دکستروز ۱۸ اکی والان) از شرکت پرتو ساخت هیراد با برند Tak Rahoo تهیه گردید. ابتدا ناخالصی‌های دانه روغنی کتان حذف، سپس توسط دستگاه پرس سرد چربی‌گیری شد. در نهایت کنجاله به‌دست آمده توسط آسیاب (توس شکن خراسان، ایران) پودر شده و تا زمان استفاده در کیسه‌های پلی اتیلنی در دمای اتاق نگهداری شدند. دانه‌های برنج شکسته پس از حذف ناخالصی‌ها آسیاب و سپس با الک مش ۴۰ اندازه ذرات آن یکنواخت شد سپس ترکیبات شیمیایی کنجاله کتان و آرد برنج توسط روش‌های استاندارد AACC (2000) اندازه‌گیری شد. مقدار رطوبت پودرکنجاله کتان چربی‌گیری شده و آرد برنج شکسته توسط دستگاه رطوبت‌سنج IR (Sartorius Ag, Germany)، مقدار پروتئین از روش کج‌لدال، چربی از روش سوکسله، خاکستر نمونه با کوره ۵۵۰ درجه سانتی گراد، فیبر توسط شرکت جوانه خراسان براساس جزء باقی مانده از نمونه پس از هضم با محلول اسید سولفوریک و هیدروکسید سدیم (پتاس جوشان) و تبدیل آن به خاکستر توسط کوره اندازه‌گیری شد.

غله صبحانه است (Brennan et al., 2016). به‌طور کلی پروفایل تغذیه‌ای برنج شامل ۸۰ درصد کربوهیدرات، ۷-۸ درصد پروتئین، ۳ درصد چربی، ۳ درصد فیبر و حاوی ۷-۸ درصد مواد معدنی و ترکیبات بیواکتیو می‌باشد (Sen et al, 2020). سلامت بخش بودن یک فراورده غذایی به حضور ترکیبات زیست فعال مانند فیبر و فنل‌ها بستگی دارد (Oliveira et al, 2018).

بذرکتنان (*Linum usitatissimum*) از لحاظ تغذیه‌ای به‌عنوان منبعی غنی از آلفالینولینیک اسید، فیبر رژیمی، ترکیبات بیواکتیو مانند لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و گاماتوکوفرول می‌باشد (Goyal et al, 2014). از آن جایی که پرولامین‌ها عامل اصلی حساسیت بیماران سلیاکی به فراورده مورد نظر هستند، می‌توان از بذرکتنان فراوری شده در فرمول فراورده‌های بدون گلوتن استفاده کرد (Santos et al., 2019). سازمان غذا و دارو آمریکا استفاده از بذرکتنان تا ۱۲ درصد در فراورده‌های غذایی را پیشنهاد کرده است (Kaur et al, 2019; Kaur et al., 2018). این بذر علاوه بر فواید تغذیه‌ای بی‌شمار دارای خواص عملکردی مهمی مانند عمل امولسیفایری و استابلیزری، خاصیت کف-کنندگی، ظرفیت اتصال آب، فعالیت ضدقارچی، اصلاح ویسکوزیته بافت و ایجاد بافت ویسکوالاستیک در فراورده‌های اکستروژن شده مانند غله صبحانه، اسنک و پاستا‌ها می‌باشد (Santos et al., 2019; Wu et al, 2010). به‌طور کلی بذر کتان حاوی ۳۰-۴۰ درصد چربی، ۳۵-۲۰ درصد فیبر رژیمی، ۳۰-۲۰ درصد پروتئین، ۸-۴ درصد رطوبت، ۴-۳ درصد خاکستر و ۱ درصد قندهای ساده است (Goyal et al, 2014). در حال حاضر مشتقات اصلاح شده نشاسته به علت افزایش کیفیت فراورده نهایی کاربرد گسترده‌ای در صنعت مواد غذایی دارند، یکی از این ترکیبات مالتودکسترین است که حاصل هیدرولیز جزئی نشاسته بوده و پلیمری از ساکاریدهای فاقد طعم شیرین است که در محصولات پخت به دلیل ایجاد حجم و بهبود بافت، حفظ رطوبت، خواص امولسیفایری، به تأخیر انداختن بیاتی و احساس دهانی مطلوب استفاده می‌شود (Chronakis, 1998). در تولید فراورده‌های آماده مصرف جهت پرک کردن، پف کردن از فرایندی به نام اکستروژن استفاده می‌شود که تحت تأثیر حرارت، فشار و نیروی برشی، ماده مذاب حاصله هنگام خروج از قالب به علت اختلاف فشار بالای بین داخل و بیرون اکستروژن به صورت ناگهانی رطوبت خود را از دست داده و منجر به ایجاد ساختار متراکم حاوی خلل و فرج می‌گردد. ویژگی‌های خلل و فرج (تخلخل، دانسیته حباب‌ها، شکل و میزان توزیع) تا حدی ویژگی‌های بافتی نهایی غله صبحانه را تعیین می‌کند، همچنین ویژگی‌های رئولوژیکی ماده مذاب تعیین کننده میزان ظرفیت انبساط فراورده است (Predon et al, 2020; Strahm, 1998).

نیروی لازم جهت نفوذ ۱۰ میلی‌متری (عمق نفوذ) این پروپ در بافت فراورده بود. در نهایت بیشینه نیروی وارد شده توسط دستگاه به‌عنوان سختی اعلام شد (Oliveira et al, 2017).

سختی بافت پس از غوطه‌وری در شیر^۳

نمونه‌های غله صبحانه در شیر کامل (چربی ۳ درصد) با دمای ۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه غوطه‌ور شدند (مقدار شیر اضافه شده باید ۴ برابر بیشتر از وزن نمونه باشد). سپس به مدت ۱۰ ثانیه عمل آب‌کشی انجام شد و در نهایت نمونه‌ها مشابه روند آزمون سختی بافت قبل از غوطه‌وری توسط دستگاه آنالیز بافت مورد آزمون قرار گرفتند (Oliveira et al, 2017).

رنگ

مقدار کافی از نمونه پودر شده غله صبحانه به داخل کاپ مخصوص دستگاه ریخته شد به‌طوری که کف ظرف کاملاً پوشیده شود سپس پارامترهای رنگی L^* (روشنایی)، a^* (سبز- قرمزی) و b^* (آبی- زردی) توسط دستگاه هانتربل (Reston VA, US) در ۳ تکرار تعیین شدند (Rhee et al, 2004).

شاخص جذب (WAI^4) و حلالیت در آب (WSI^5)

ابتدا ۲/۵ گرم از نمونه آسیاب شده به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری از پیش توزین شده اضافه شد سپس ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و توسط ورتکس به مدت دو دقیقه هم زده شد، در مرحله بعد مخلوط حاصل در سرعت (g) ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از حذف مایع رویی وزن لوله حاوی ژل توزین شد. شاخص جذب آب برحسب گرم آب باند شده توسط ۲/۵ گرم از نمونه بر مبنای خشک طبق معادله ذیل محاسبه گردید (Alam et al, 2019). برای تعیین شاخص حلالیت، مایع رویی خارج شده در مرحله شاخص جذب آب، به پلیتی که از قبل توزین شده بود انتقال یافت. سپس در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آب آن به‌طور تبخیر شود و در نهایت توزین و مقدار از معادله زیر به‌دست آمد (Alam et al, 2019).

$$(۱) \quad \text{وزن ژل باقی مانده} / \text{وزن نمونه} = \text{شاخص جذب آب}$$

$$(۲) \quad \text{وزن ماده خشک محلول} / \text{وزن نمونه} = \text{شاخص حلالیت در آب}$$

ارزیابی حسی

برای محاسبه میزان کربوهیدرات از طریق کسر درصد کلیه ترکیبات از ۱۰۰ انجام شد.

تهیه فرمولاسیون و آماده‌سازی جهت اعمال فرایند اکستروژن

ابتدا با توجه به میزان رطوبت مواد اولیه و سطوح رطوبتی مورد نظر (۱۲، ۱۵ و ۱۸ درصد)، توسط مربع پیرسون مقدار آب لازم محاسبه گردید، سپس در نسبت‌های مختلف ۱۰ درصد پودرکنجاله کتان (۸۰ درصد آرد برنج، ۱۰ درصد مالتودکستترین)، ۲۰ درصد پودرکنجاله کتان (۷۰ درصد آرد برنج، ۱۰ درصد مالتودکستترین)، ۳۰ درصد پودرکنجاله کتان (۶۰ درصد آرد برنج، ۱۰ درصد مالتودکستترین) اختلاط انجام شد. پس از مخلوط کردن در کیسه‌های پلی اتیلنی، بسته‌بندی شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، داخل یخچال (جهت توزیع یکنواخت رطوبت در نمونه) نگهداری شدند.

شرایط فرایند اکستروژن

نمونه‌های غله صبحانه، توسط دستگاه اکسترودر جفت مارپیچی همگرد (Jinan Saxin, China) تحت شرایط سرعت خوراک ۱/۵ کیلوگرم بر ساعت، دمای ۱۴۰ درجه سانتی گراد، قطر منفذ خروجی ۳ میلی‌متر، سرعت مارپیج (۱۴۰، ۱۷۰، ۲۰۰ دور بر دقیقه)، مقدار رطوبت (۱۲، ۱۵ و ۱۸ درصد) و میزان پودر کنجاله کتان (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) تولید شدند، به‌منظور خشک کردن از آون هوای داغ (Binder Germany) (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد سپس نمونه‌ها تا هنگام انجام آزمون‌های مورد نظر در کیسه‌های پلی‌اتیلنی نگهداری شدند.

نسبت انبساط^۱

از هر تیمار ۱۰ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب و قطر دو قسمت متفاوت از فراورده اکسترودر شده توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد سپس از طریق تقسیم میانگین قطر (میلی‌متر) بر قطر قالب اکسترودر (۴ میلی‌متر) نسبت انبساط محاسبه گردید (Brennan et al, 2008).

سختی بافت^۲

میزان سختی بافت توسط دستگاه آنالیز بافت (TA plus Ametek, UK) تعیین شد. از هر تیمار ۲ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب شد و روند آزمون به صورت نفوذ پروپ استوانه‌ای به قطر ۲ میلی‌متر به داخل نمونه با سرعت ثابت یک میلی‌متر در ثانیه و اندازه‌گیری حداکثر

شد. در طرح آزمایش شش نقطه مرکزی برای محاسبه تکرارپذیری و خطای آزمایش تعیین شد. برای توصیف مدل‌ها از معادله زیر استفاده شد، Y (توابع پاسخ) و $i = 1, 2, 3$ (متغیرهای مستقل) می‌باشد.

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (3)$$

ضرایب مدل با b (ضریب ثابت)، b_1 ، b_2 و b_3 (اثر خطی)، b_{11} ، b_{22} و b_{33} (اثر درجه دوم)، b_{12} ، b_{13} و b_{23} (اثر متقابل) نشان داده شده است. اثرات معنی‌دار در مدل با تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) برای هر پاسخ مشخص شد. R^2 (ضریب تبیین)، $Adj-R^2$ (ضریب تبیین تصحیح شده) CV (ضریب تغییرات) برای مناسب بودن مدل پیش‌بینی شده مورد بررسی قرار گرفت. شرایط بهینه، با استفاده از تکنیک بهینه سازی عددی انتخاب شد. برای متغیرهای مستقل محدوده، در حالی که برای پاسخ‌ها حداکثر یا حداقل یا محدوده در نظر گرفته شد.

با استفاده از آزمون لذت‌بخشی ۵ نقطه‌ای (۱ = خیلی بد، ۵ = خیلی خوب) ظاهر، رنگ، عطر و طعم، بافت (سختی) و پذیرش کلی فراورده های غله صبحانه توسط ۱۰ ارزیاب انجام گرفت. جهت آماده سازی، از هر تیمار ۱۰ عدد نمونه به طور تصادفی انتخاب شد سپس در ۴۰ میلی-لیتر شیر (چربی ۳ درصد و دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳ دقیقه غوطه‌ور شدند سپس عمل ارزیابی حسی مورد آزمون قرار گرفت (Oliveira et al, 2018).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل (کنجالة کتان (x_1)، سرعت چرخش ماریچ (x_2) و رطوبت (x_3)) بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر استفاده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Design Expert ۷،۰،۰ انجام

جدول ۱- ترکیب شیمیایی کنجاله کتان، آرد برنج و مالتودکسترین بر مبنای ماده خشک (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

Chemical compositions (%)	Flaxseed oil cake	Broken rice	Maltodextrin
Protein	34.56 $\pm$ 0.26	10.90 $\pm$ 0.13	0.4
Fat	16.69 $\pm$ 0.33	1.05 $\pm$ 0.2	-
Total fiber	12.90 $\pm$ 0.37	4.05 $\pm$ 0.13	-
Moisture	7.46 $\pm$ 0.19	9.13 $\pm$ 0.04	6
Ash	4.28 $\pm$ 0.01	0.87 $\pm$ 0.001	0.3
Carbohydrate	24.11 $\pm$ 0.38	74 $\pm$ 0.05	18

(Manjula et al, 2014). با افزایش مقدار کنجاله کتان، نسبت انبساط به علت افزایش میزان فیبر، به طور قابل توجهی از ۳/۹۳ به ۲/۶۳ کاهش یافت (شکل ۱). با افزایش میزان جایگزینی آرد برنج با کنجاله کتان، مقدار نشاسته در فرمول نهایی کاهش یافته و به علت کمپلکسی که بین فیبر با نشاسته و فیبر با آب ایجاد می‌شود ژلاتینه شدن نشاسته محدود خواهد شد. فیبر باعث شکستن دیواره سلول‌های هوا قبل از گسترش کامل حباب‌ها شده و در نتیجه ساختاری با انبساط کمتر، تخلخل کمتر و دانسیته بالاتر ایجاد می‌گردد (Oliveira et al, 2015; Oliveira et al., 2018). اثرات مشابه فیبر بر نسبت انبساط توسط محققین مشاهده شده است (Brennan et al, 2016; Carvalho et al, 2012). همچنین با افزایش میزان پروتئین خوراک، نیروی برشی ماریچ اکسترودر کاهش یافته و از سوی دیگر بر توزیع آب در ماتریکس بین سلولی و افزایش پیوند تأثیر گذاشته و سبب کاهش نسبت انبساط می‌گردد (Brennan et al., 2016). مشابه این اثر توسط محققین مشاهده شد که مقدار بالای پروتئین سبب کمتر شدن

نتایج و بحث

تعیین ترکیبات شیمیایی

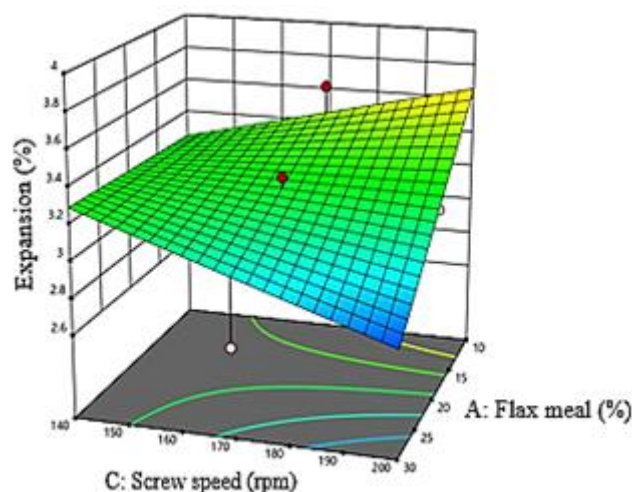
جدول ۱

نسبت انبساط

نسبت انبساط پارامتری جهت توصیف میزان گسترش حجمی ماده مذاب خروجی از اکسترودر در جهت عمودی است (Falcone and Phillips, 1988). در اصل میزان انبساط وابسته به اختلاف فشار بین اتمفسر و قالب است (Mesquita et al, 2013). مراحل مکانیکی انبساط شامل تغییر شکل نشاسته، تشکیل هسته حباب‌ها، رشد حباب‌ها و فروپاشی حباب‌ها می‌باشد (Moraru and Kokini, 2003). مقدار انبساط و حجم فراورده اکسترودر شده مرتبط با ژلاتینه شدن نشاسته بوده و اغلب به رطوبت خوراک، دما، زمان اقامت ماده مذاب در اکسترودر، تعداد، اندازه و توزیع سلول‌های هوای محصور شده توسط ماده غذایی بستگی دارد. میزان الاستیسیته ماده مذاب بیشترین اثر را بر این شاخص دارد (Santos et al, 2019; Mesquita et al, 2013).

گسترش طولی فراورده در سرعت‌های بالا باشد (Moraru and Kokini, 2003; O'shea et al, 2014; Pansawat et al, 2008). Mesa و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که کاهش رشد حباب‌ها و ایجاد تعداد زیادی حباب‌های با اندازه کوچک می‌تواند دلیلی بر کاهش میزان انبساط فراورده در سرعت‌های ماریپیج بالا باشد (Mesa et al., 2009).

ویسکوزیته ماده مذاب و در نتیجه کاهش انبساط شد (Meng et al, 2006; Onwulata and Konstance, 2010). با افزایش سرعت ماریپیج در سطوح جایگزینی بالا، نسبت انبساط کاهش یافت (شکل ۱). به علت افزایش نیروی برشی در سرعت ماریپیج بالا، میزان دکسترینه شدن و تخریب نشاسته افزایش یافته و به موجب آن ویژگی‌های خمیری شدن نشاسته کاهش یافته و در نتیجه میزان حجم فراورده کاهش پیدا می‌کند. این امر همچنین می‌تواند به علت بیشتر شدن



شکل ۱- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر نسبت انبساط، اثر میزان کنجاله کتان و سرعت ماریپیج در رطوبت ۱۵ درصد در دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 1. Effect of extrusion conditions: flax cake, screw speed on the expansion ratio

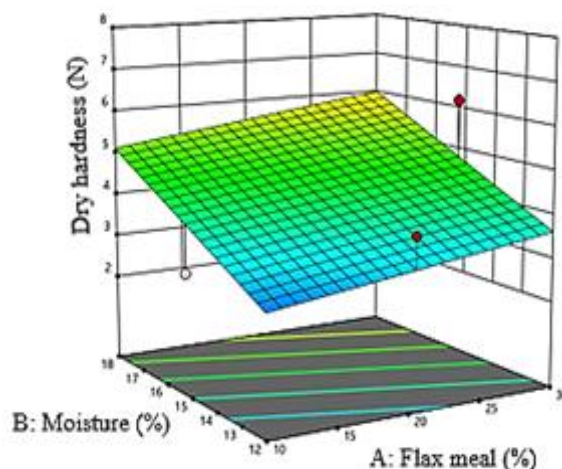
سختی بافت

سختی بافت پس از غوطه‌وری در شیر
طول مدتی است که فراورده غله صبحانه می‌تواند تردی بافت خود را بعد از خیساندن در شیر حفظ کند (Kumari et al, 2019). به طور کلی میزان این شاخص مرتبط با یکپارچگی ساختار، ظرفیت جذب آب، حلالیت و دانسیته غله صبحانه است (Cheewapramong et al, 2002). تردی بافت یک عامل بسیار مهم و موثر در قابلیت پذیرش و مصرف فراورده‌های غلات صبحانه است. پس از غوطه‌ور کردن غله صبحانه در شیر تغییراتی که در ویژگی‌های ریز ساختاری فراورده ایجاد می‌شود به علت نقش پلاستی‌سایزری ترکیبات آمورف مانند نشاسته و پروتئین‌ها است. نتیجه این تغییر کاهش نیروی مورد نیاز جهت له‌شدن فراورده و کاهش تردی فراورده می‌باشد (Oliveira et al, 2018). افزایش میزان کنجاله کتان به دلیل افزایش مقدار فیبر، پروتئین و چربی فراورده سبب کاهش سختی بافت و افزایش انسجام بافت نمونه‌ها (بعد از غوطه‌وری در شیر) از ۰/۷۹ به ۱۰/۶۱ نیوتن گردید (شکل ۳، الف و ب). با افزایش میزان فیبر نامحلول غله صبحانه در سطوح جایگزینی بالا به علت سخت‌تر شدن مسیر جریان و متراکم‌تر شدن ساختار

درک مصرف‌کننده از سختی و تردی بافت مرتبط با میزان انبساط و ساختار سلول‌های ماده اکستروژن شده است (Ding et al, 2005). با افزایش میزان رطوبت خوراک، سختی بافت از ۲/۸ به ۷/۱۲ نیوتن افزایش یافت (شکل ۲). به‌طور کلی فراورده‌های با دانسیته حجمی بالا و نسبت انبساط پایین، تعداد حفرات کمتر و دیواره سلولی ضخیم‌تری دارند بنابراین نیاز به نیروی شکست بیشتری داشته و بافت سخت‌تری خواهند داشت (Cheewapramong et al, 2002). رطوبت می‌تواند به عنوان روان‌کننده سبب کاهش نیروی برشی و دمای فرایند شده در نتیجه میزان پخت ماده مذاب کاهش یافته و سبب ایجاد فراورده ای با انبساط پایین و سختی بالا شود (Ravindran et al, 2011). همچنین رطوبت بالا رشد حباب‌ها و سلول‌های هوا را در فراورده محدود کرده، سبب فشرده شدن حباب‌ها و کاهش میزان نشاسته پخته شده می‌شود، در نتیجه این امر سبب متراکم شدن بافت و سخت‌تر شدن بافت محصول می‌گردد (Rudra et al, 2015; Ding et al, 2005). نتایج مشابه اثر رطوبت بر سختی بافت توسط محققان مشاهده شد (Wójtowicz et al, 2013; Liu et al, 2000).

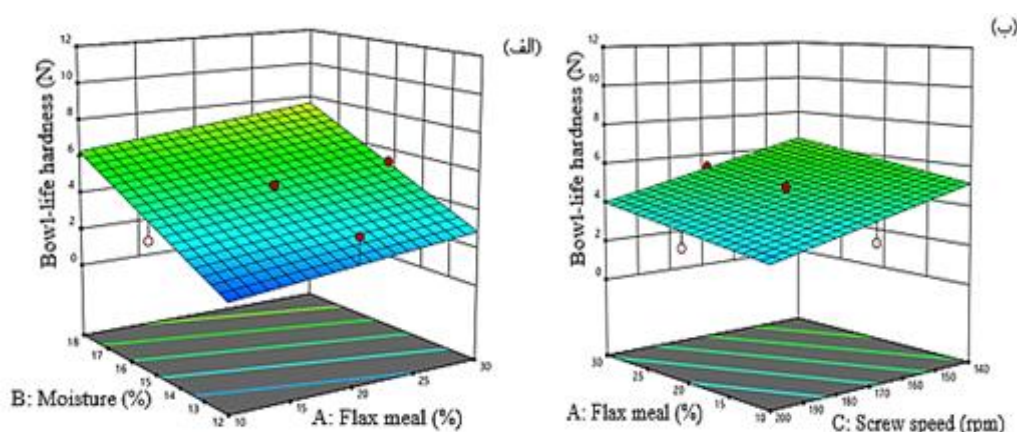
می‌یابد، اما جهت حفظ انسجام بافت باید میزان فیبر فراورده بهینه باشد (Oliveira et al, 2017; Chassagne et al, 2011).

فراورده، جذب رطوبت کمتر شده و به سبب این امر غله صبحانه بعد از غوطه‌ور کردن در شیر بافت مستحکمی دارد و انسجام بافت افزایش



شکل ۲- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر سختی بافت، اثر میزان کنجاله کتان و رطوبت در سرعت مارییج ۱۷۰ دور بر دقیقه در دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 2. Effect of extrusion conditions: flax cake, moisture on the Dry hardness



شکل ۳- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر سختی بافت پس از غوطه‌وری در شیر (الف) اثر مقدار کنجاله کتان و رطوبت در سرعت مارییج ۱۷۰ دور بر دقیقه (ب) اثر میزان کنجاله کتان و سرعت مارییج در رطوبت ۱۵ درصد و دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 3. Effect of extrusion conditions: flax cake, moisture content (a), flax cake, screw speed on bowl life hardness

برشی کاهش و انسجام بافت افزایش می‌یابد. بنابراین غله صبحانه‌ای که پس از غوطه‌ور شدن در شیر بافت خود را حفظ کند نماینده بافت مناسب آن فراورده است (Oliveira et al, 2017; Medina et al, 2013; Machado et al, 1999). در پژوهش انجام شده توسط Ferreira و همکاران (۲۰۲۱) فاز محلول شیر به‌عنوان پلاستی‌سایزر سبب کاهش نیروی برشی شد همچنین بخش محلول در آب فیبر رژیمی اینولین می‌تواند با فاز محلول شیر برهمکنش ایجاد کند و باعث کاهش نیروی برشی فراورده گردد. در واقع مقدار جذب آب الگوی خوبی است که میزان انسجام بافت نمونه‌ها را نشان می‌دهد، به این صورت

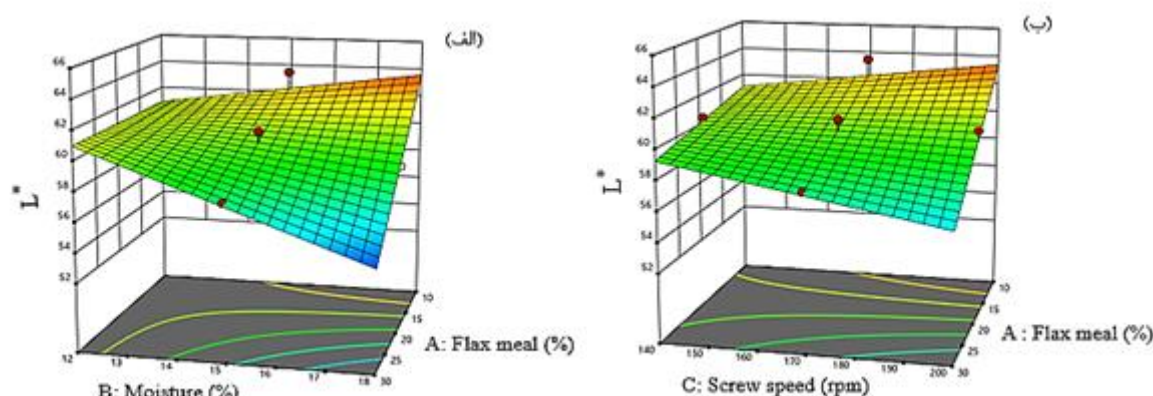
همچنین Ferreira و همکاران (۲۰۲۱) مشاهده کردند که با افزودن فیبر رژیمی اینولین به غله صبحانه نیروی برشی مورد نیاز کاهش یافت اما بعد از غوطه‌وری بافت فراورده دچار شکنندگی و له‌شدگی نشد (Ferreira et al, 2021). با افزایش میزان رطوبت خوراک، سختی بافت بعد از غوطه‌وری در شیر کاهش و انسجام بافت افزایش یافت (شکل ۳، الف). بعد از غوطه‌ور کردن در شیر به دلیل تشکیل لایه‌ای از لیپید و میسل بر سطح فراورده غله صبحانه، مانع انتقال جرم و جذب رطوبت شده بنابراین، جذب رطوبت توسط فراورده نسبت به حالت غوطه‌وری در آب کاهش یافته می‌یابد و در نتیجه نیروی

مالتودکسترین نیز به عنوان یکی از اجزای ثابت فرمولاسیون سبب حفظ تردی و انسجام بافت پس از غوطه‌وری در شیر شد (Culbertson, 2004).

رنگ

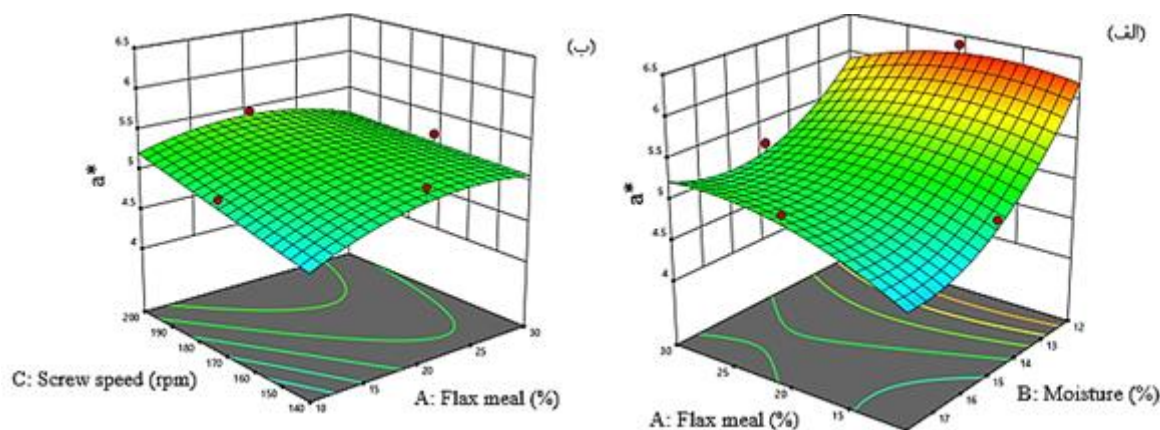
در فراورده‌های اکستروژن شده عوامل اصلی تغییر رنگ فراورده، واکنش‌های قهوه ای شدن غیرآنزیمی (مایلارد و کاراملیزاسیون)، دنا توره شدن پروتئین‌ها و تخریب رنگدانه‌ها می‌باشند (Oliveira et al, 2009; Rosentrater et al, 2018). با افزایش مقدار کنجاله کتان میزان شاخص روشنایی از ۶۴/۴۲ به ۵۳/۳۴ کاهش، شاخص قرمزی از ۴/۰۹ به ۶/۳۸ افزایش و شاخص زردی از ۲۳/۹۷ به ۱۹/۴۹ کاهش یافت (شکل ۴، الف و ب، شکل ۵، الف و ب، شکل ۶، الف و ب).

که نمونه‌ای که جذب آب بالایی دارد در مقایسه با نمونه‌ای که جذب آب پایینی دارد بافت آن سریع‌تر سست می‌شود بنابراین این امکان وجود دارد که از طریق کاهش میزان جذب آب زمان انسجام بافت نمونه غله صبحانه اکستروژن شده را طولانی کرد (Ferreira et al, 2021). تفاوت در میزان جذب آب می‌تواند مربوط به تفاوت‌هایی در ترکیب نشاسته یا فیبر رژیمی دانه‌های مختلف باشد (Brennan et al, 2012). با افزایش سرعت چرخش ماریچ سختی بافت افزایش و انسجام بافت کاهش یافت (شکل ۳، ب). با افزایش سرعت چرخش ماریچ، وزن مولکولی آمیلوز و آمیلوپکتین نشاسته پس از فرایند اکستروژن کاهش می‌یابد، این امر سبب افزایش ظرفیت جذب آب و منجر به افزایش له شدگی غله صبحانه در شیر می‌شود، همچنین با افزایش مقدار نشاسته آسیب دیده، اندازه خلل و فرج کوچک‌تر، بافت نرم‌تر و افزایش میزان چسبندگی فراورده را موجب می‌شود (Colonna et al, 1984).



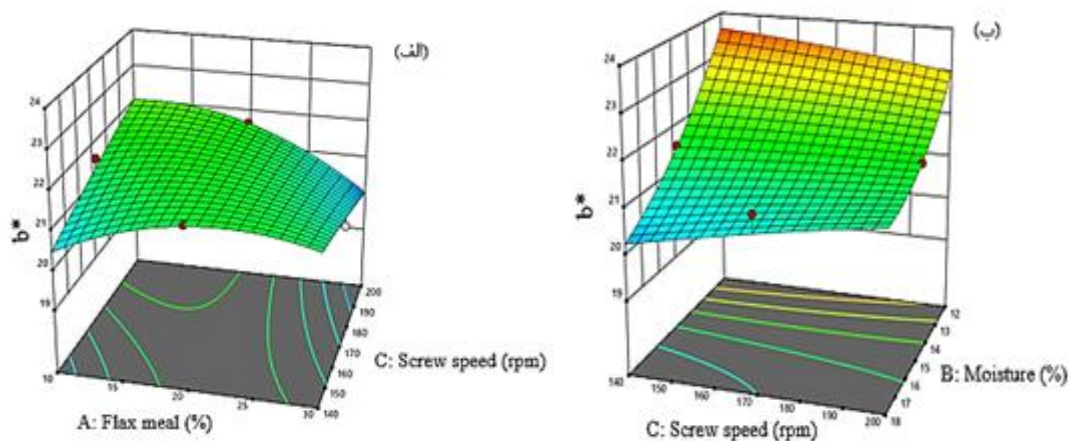
شکل ۴- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر L^* (الف) اثر میزان کنجاله کتان و رطوبت در سرعت ماریچ ۱۷۰ دور بر دقیقه (ب) اثر مقدار کنجاله کتان و سرعت ماریچ در رطوبت ۱۵ درصد و دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 4. Effect of extrusion conditions: flax cake, moisture content (a), flax cake, screw speed on L^*



شکل ۵- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر a^* (الف) اثر مقدار کنجاله کتان و رطوبت در سرعت ماریچ ۱۷۰ دور بر دقیقه (ب) اثر میزان کنجاله کتان و سرعت ماریچ در رطوبت ۱۵ درصد و دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 5. Effect of extrusion conditions: flax cake, moisture content (a)- flax cake, screw speed on a^*



شکل ۶- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر b^* (الف) اثر میزان کنجاله کتان و سرعت ماریچ در رطوبت ۱۵ درصد (ب) اثر سرعت ماریچ و رطوبت در سطح کنجاله ۲۰ درصد و دمای ۱۴۰ درجه سانتی گراد.

Fig. 6. Effect of extrusion conditions: flax cake, moisture content (a)- flax cake, screw speed on a^*

نوعی ارزن با افزایش رطوبت مشاهده شده است (Gulati et al, 2016). با افزایش سرعت چرخش ماریچ شاخص روشنایی کاهش و شاخص قرمزی و زردی افزایش یافت (شکل ۴، ب؛ شکل ۵، ب؛ شکل ۶، ب). افزایش سرعت ماریچ به دلیل کاهش زمان اقامت خوراک داخل اکسترودر و همچنین کاهش زمان حرارت، تخریب رنگدانه‌ها کاهش یافته و رنگ فراورده تیره‌تر می‌گردد (Gümüsay et al, 2019; Nazir et al, 2016). Gulati و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند با افزایش سرعت ماریچ شاخص زردی در آرد نوعی ارزن افزایش یافت (Gulati et al, 2016).

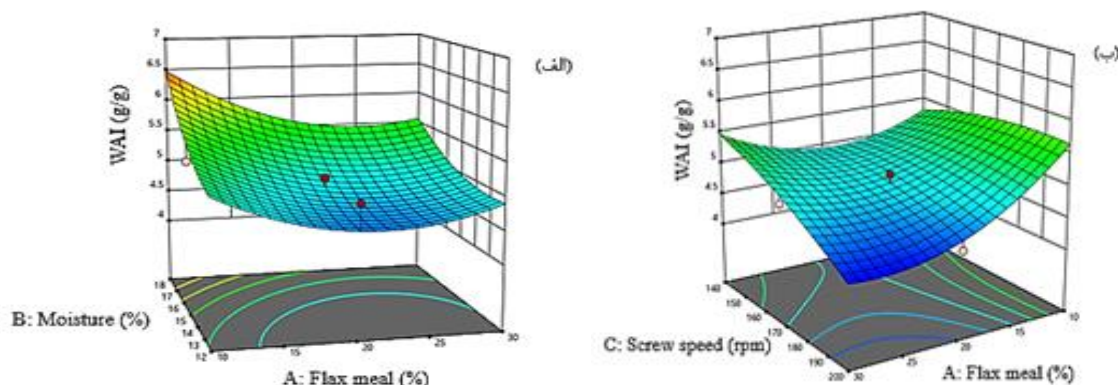
شاخص جذب آب (WAI)

این شاخص بیانگر میزان آب جذب شده توسط گرانول‌های نشاسته است و به‌عنوان معرف ژلاتینه شدن می‌باشد. شاخص جذب آب با حجم نشاسته رابطه مستقیم دارد و میزان تجزیه هیدرولیکی نشاسته را نشان می‌دهد (Yadav et al, 2014; Singh et al, 2014; Lazou and Krokida, 2010). به‌طور کلی هرچقدر زنجیره‌های آمیلوز و آمیلوپکتین نشاسته کمتر آسیب دیده باشند و گروه‌های هیدروفیل بیشتری در سطح خارجی مولکول قرار گیرند، امکان اتصالات با آب افزایش و در نتیجه میزان جذب آب افزایش می‌یابد (Singh et al, 2014; Lazou and Krokida, 2010). در فراورده‌های با ساختمان به هم فشرده و متراکم به واسطه جذب آب پایین در هنگام غوطه‌ور کردن در شیر بافت فراورده حفظ می‌شود (Carvalho et al, 2012). با افزایش میزان کنجاله کتان مقدار جذب آب از ۶/۷۰ (g/g) به ۴/۲۸ کاهش یافت (شکل ۹، الف و ب). از آن جایی‌که فیبرها ظرفیت اتصال آب و سرعت جذب آب بالاتری از نشاسته و پروتئین‌ها دارند سبب عدم

با افزایش سطح کنجاله کتان به علت افزایش میزان رنگدانه‌های قهوه‌ای و همچنین افزایش ترکیبات پروتئینی در خوراک، باعث افزایش واکنش مایلارد بین اسید آمینه لیزین و قندهای احیاکننده می‌شود و در نهایت سبب تیره‌تر شدن رنگ فراورده و کاهش شاخص روشنایی، زردی و افزایش شاخص قرمزی خواهد شد (Kaur et al, 2018; Jaya et al, 2014; Marpalle et al, 2014; Koca & Anil, 2007; Garden-Robinson, 1993). نتایج مشابه توسط (Kaur et al, 2013; Mesquita et al, 2019) مشاهده شد. علاوه بر این با افزایش میزان پروتئین و فیبر خوراک میزان ژلاتینه شدن نشاسته کاهش پیدا می‌کند که این امر سبب کاهش انبساط طولی و عرضی فراورده و به موجب آن افزایش دانسیته حجمی می‌شود. این بدان معنی است که نسبت سطح به حجم کاهش یافته و پراکندگی رنگدانه‌ها در سطح فراورده کاهش پیدا کرده در نتیجه رنگ نهایی محصول تیره‌تر می‌شود (Jozinović et al, 2016). با افزایش رطوبت میزان شاخص روشنایی، شاخص قرمزی و شاخص زردی کاهش یافت (شکل ۴، الف، شکل ۵، الف و شکل ۶، ب). افزایش رطوبت از طریق کاهش انبساط همانطور که ذکر شد سبب کاهش پراکنش رنگدانه‌ها می‌شود. علاوه بر این، در رطوبت بالا دمای مذاب و ویسکوزیته کاهش یافته و به سبب آن تخریب رنگدانه‌ها در اکسترودر کاهش و رنگ فراورده تیره‌تر و شاخص‌های روشنایی، قرمزی و زردی کاهش می‌یابد (Nazir et al, 2016; Liu et al, 2000). برخی پژوهش‌ها گزارش کردند با افزایش رطوبت شاخص روشنایی کاهش یافت (Oliveira et al, 2017; Ilo & Berghofer, 1999). Gümüsay و همکاران (۲۰۱۹) نیز کاهش شاخص زردی با افزایش رطوبت را برای فراورده بر پایه ذرت بیان کردند (Gümüsay et al, 2019). همچنین کاهش شاخص قرمزی در آرد

(Singh, 2011; Ravindran et al, 2011). نتایج مشابهی گزارش شده است (Singh, 2005; Ding et al, 2007; et al, 2007). افزایش سرعت چرخش ماریچ باعث کاهش میزان جذب آب فراورده نهایی شد (شکل ۷، ب). با افزایش نیروی برشی اکسترودر بر نشاسته میزان تجزیه و دکستریزه شدن نشاسته افزایش یافته و منجر به باز شدن زنجیره‌های آمیلوز و آمیلوپکتین می‌گردد، بنابراین مولکول‌های با وزن پایین حاصل می‌شوند که سبب افزایش حلالیت شده و به دلیل اینکه قابلیت دسترسی مولکول‌های آب به گروه‌های هیدروفیل کاهش می‌یابد موجب کاهش میزان جذب آب می‌شود (Singh et al, 2014). همچنین افزایش سرعت ماریچ سبب تسریع تخریب اتصالات عرضی بین اجزای نشاسته، پروتئین و چربی شده و در نتیجه سبب انحلال ترکیبات پلی ساکاریدی و پروتئینی گردیده که در نهایت میزان جذب آب فراورده کاهش می‌یابد (Singh et al, 2014). نتایج مشابه مشاهده شده است (Jacques-Fajardo et al, 2017; Wani and Kumar, 2016).

دسترسی گروه‌های هیدروفیل نشاسته به مولکول‌های آب شده و در نتیجه میزان جذب آب کاهش می‌یابد (Altan et al, 2008; Brennan et al, 2008). اثرات مشابه مشاهده شده است (Yağcı, 2007; Singh et al, 2007; and Göğüş, 2008). علت دیگر این امر می‌تواند مربوط به تغییر اتصالات عرضی ایجاد شده بین گروه‌های هیدروفیل OH, COOH, SH و NH₂ با نشاسته در اثر حرارت باشد نتیجه این امر باعث کاهش جذب آب نشاسته می‌گردد (Yadav et al, 2014; Wootton and Bamunuarachchi, 1978). چربی عامل دیگری است که از طریق کاهش قسمت‌های در دسترس برای اتصال گروه‌های آب دوست با آب سبب کاهش میزان جذب آب فراورده می‌گردد (Adebowale et al, 2005; Heywood et al, 2002). با افزایش رطوبت میزان جذب آب فراورده افزایش یافت (شکل ۷، الف). آب به‌عنوان پلاستی‌سایزر در طی فرایند اکستروژن می‌تواند سبب کاهش نیروی برشی شود بنابراین تخریب نشاسته کاهش یافته و به سبب آن میزان جذب آب افزایش می‌یابد (Sharma et al, 2017; Singh et al, 2014).



شکل ۷- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر WAI (الف) اثر میزان کنجاله کتان و رطوبت در سرعت ماریچ ۱۷۰ دور بر دقیقه (ب) اثر مقدار کنجاله کتان و سرعت ماریچ در رطوبت ۱۵ درصد و دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 7. Effect of extrusion conditions: flax cake, moisture content (a)- flax cake, screw speed on WAI

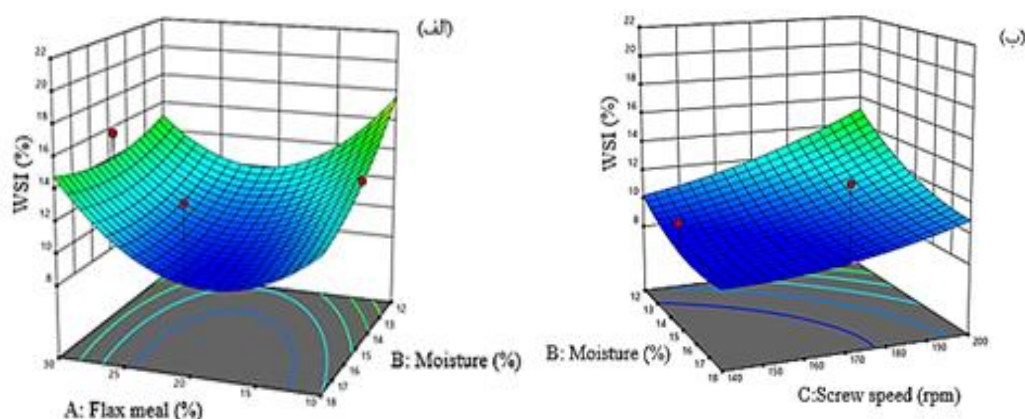
(Wójtowicz et al, 2014; et al, 2014). نتایج مشابهی مشاهده شده است (Ding et al, 2005; 2015). با افزایش سرعت ماریچ میزان شاخص حلالیت در آب از ۹ به ۲۱/۳۳ درصد افزایش یافت (شکل ۸، ب). در سرعت‌های ماریچ بالا به علت افزایش انرژی مکانیکی و نیروی برشی ماریچ، ماکرومولکول‌ها تخریب شده و مولکول‌های با وزن مولکولی پایین و حلالیت بالا تولید می‌گردد (Singh et al, 2014; Doğan, 2003; and Karwe, 2003). با افزایش مقدار کنجاله کتان تا سطح ۲۰ درصد میزان شاخص حلالیت در آب کاهش سپس با افزایش مجدد تا سطح ۳۰ درصد میزان این شاخص افزایش یافت (شکل ۸، الف). فیبر بالای خوراک می‌تواند سبب از هم گسیختگی ساختمان پیوسته ماده مذاب در اکسترودر شده و از تغییر شکل الاستیک آن طی فرایند جلوگیری کند.

شاخص حلالیت در آب (WSI)

این شاخص معرف تجزیه ترکیبات مولکولی است و مبین میزان ترکیبات با وزن مولکولی پایین محلول آزاد شده از نشاسته در طی فرایند اکستروژن می‌باشد (Pardhi et al, 2019). این ترکیبات محلول در آب می‌تواند حاصل تجزیه نشاسته یا دناتوراسیون پروتئین‌ها و فیبرها باشد (Selani et al, 2014). افزایش رطوبت موجب کاهش میزان شاخص حلالیت در آب شد (شکل ۸، الف). علت این امر می‌تواند مربوط به نقش پلاستی‌سایزری رطوبت در مقادیر بالا باشد که سبب کاهش نیروی برشی ماریچ شده و در نتیجه به‌عنوان اثر محافظتی روی بیومولکول‌ها عمل می‌کند و باعث کاهش آسیب پلیمرها و مولکول‌های آزاد شده در طی فرایند می‌شوند (Selani, 2017; Sharma et al, 2017).

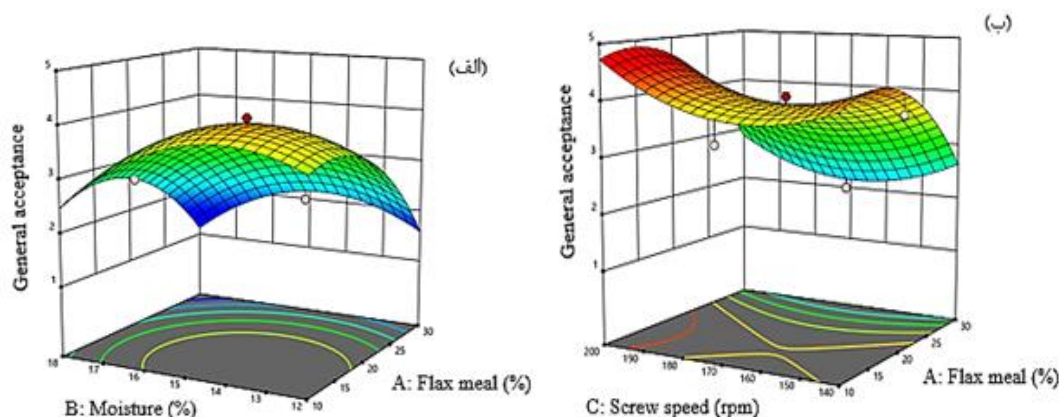
ترکیبات فیبر به مولکول‌های کوچک‌تر باشد. همچنین فیبر در مقادیر بالا سبب جذب بیشتر آب شده و در نتیجه میزان ژلاتینه شدن کاهش یافته و منجر به حل شدن بیشتر مولکول‌های نشاسته و افزایش شاخص حلالیت می‌گردد (Larrea et al, 2005). اثر مشابهی گزارش شده است (Altan et al, 2008; Moraru & Kokini, 2003).

این امر سبب ممانعت از تخریب ماکرومولکول‌ها می‌گردد در نتیجه میزان حلالیت فراورده مولکول‌ها کاهش می‌یابد. همچنین اتصال بیشتر نشاسته با پروتئین و چربی می‌تواند منجر به کاهش شاخص حلالیت گردد (Yağcı & Göğüş, 2008). نتایج مشابهی گزارش شده است (Huang et al., 2014; Moraru and Kokini, 2003). افزایش شاخص حلالیت در سرعت ماریچ بالتر می‌تواند به علت تجزیه



شکل ۸- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر WSI (الف) اثر سطح کنجاله کتان و رطوبت در سرعت ماریچ ۱۷۰ دور بر دقیقه (ب) اثر سطح رطوبت و سرعت ماریچ در سطح کنجاله کتان ۲۰ درصد و دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد

Fig. 8. Effect of extrusion conditions: flax cake, moisture content (a)- flax cake, screw speed on WSI



شکل ۹- اثر متغیرهای فرایند اکستروژن بر پذیرش کلی (الف) اثر مقدار کنجاله کتان و رطوبت در سرعت ماریچ ۱۷۰ دور بر دقیقه (ب) اثر میزان کنجاله کتان و سرعت ماریچ در سطح رطوبت ۱۵ درصد و دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 9. Effect of extrusion conditions: flax cake, moisture content (a)- flax cake, screw speed on Total acceptance

همچنین به علت افزایش رنگدانه‌های قهوه‌ای رنگ فراورده تیره‌تر شد و از لحاظ طعمی میزان تلخی آن افزایش یافت (شکل ۹، الف و ب) (Kaur et al, 2018; Marpalle et al, 2014; Riaz and Rokey, 2011; Ahmed et al, 1999). با افزایش رطوبت تا سطح ۱۵ درصد میزان پذیرش کلی افزایش و سپس با افزایش بیشتر رطوبت تا سطح

آزمون حسی

با افزایش مقدار کنجاله کتان تا سطح ۲۰ درصد میزان پذیرش کلی افزایش سپس در سطوح بالاتر کاهش یافت (محدوده تغییرات از ۱/۶ تا ۴/۶)، علت این امر حضور مقادیر بیشتر فیبر، چربی و پروتئین است که سبب افزایش سختی بافت و ناهمواری سطح فراورده گردید و

مسیر جریان، جذب رطوبت کمتر شده و در نتیجه مانع انبساط فراورده و افزایش دانسیته توده و سختی بافت را موجب می‌شود، همچنین با افزایش رطوبت (میزان شیر) به دلیل تشکیل لایه‌ای از لیپید و میسل بر سطح فراورده مانع انتقال رطوبت و جذب آن شده بنابراین سختی بافت کاهش و انسجام بافت پس از غوطه‌وری افزایش می‌یابد. در واقع مقدار جذب رطوبت الگوی خوبی است که میزان انسجام بافت نمونه‌ها را نشان می‌دهد از این رو در مقادیر بالای کنجاله کتان، به علت ظرفیت اتصال آب و سرعت جذب آب بالاتر فیبر نسبت به نشاسته و پروتئین‌ها، فراورده ساختار به هم فشرده و متراکم دارد که سبب افزایش زمان حفظ بافت غله صبحانه می‌شود. همچنین رطوبت می‌تواند به عنوان پلاستی‌سایزر سبب کاهش نیروی برشی گردد و مقدار جذب رطوبت فراورده را افزایش دهد. در حالی که با افزایش سرعت چرخش مارپیچ اثر نیروی برشی بر دکستریزه شدن نشاسته بیشتر شده و سبب کاهش جذب رطوبت می‌گردد. از دیگر ویژگی‌های مهم غلات صبحانه شاخص روشنایی می‌باشد که بیشترین مقدار آن در سرعت چرخش مارپیچ، رطوبت و سطح کنجاله کتان پایین حاصل شد. در بررسی خصوصیات حسی فراورده‌های تولید شده در سطوح کنجاله کمتر از ۲۰ درصد، مقادیر رطوبت کمتر از ۱۵ درصد و سرعت مارپیچ ۲۰۰ دور بر دقیقه بیشترین میزان پذیرش کلی را نشان داد. نتایج بهینه‌یابی نشان داد غلات صبحانه حاوی ۱۷ درصد کنجاله کتان، رطوبت خوراک ۱۳/۸۹ درصد و سرعت چرخش مارپیچ ۱۷۰ دور بر دقیقه بهترین فراورده با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مطلوب بود.

۱۸ درصد، میزان این امتیاز کاهش یافت، به نظر می‌رسد با افزایش رطوبت به علت نقش پلاستی‌سایزری رطوبت بر نشاسته و همچنین کاهش دمای اکسترودر سبب کاهش میزان نشاسته پخته شده و کاهش ویسکوزیته گشته بنابراین فراورده ای با تراکم بالا و سختی زیاد ایجاد می‌گردد (شکل ۹، الف) (Santos et al, 2019; Kaur et al, 2018; Rudra et al, 2015; Ding et al, 2005). با افزایش سرعت چرخش مارپیچ تا سرعت ۱۷۰ دور بر دقیقه میزان پذیرش کلی کاهش سپس با افزایش سرعت تا ۲۰۰ دور بر دقیقه میزان این امتیاز افزایش یافت (شکل ۹، ب) این امر به علت زمان کمتر اقامت خوراک در اکسترودر و تخریب کمتر نشاسته است که به طبع آن ژلاتینه شدن نشاسته و رشد حباب‌ها افزایش یافته و در نتیجه حجم فراورده افزایش و میزان سختی بافت کاهش می‌یابد در حالی که به نظر می‌رسد نیروی برشی بالا سبب تخریب بیشتر رنگدانه‌ها شده در نتیجه رنگ فراورده روشن‌تر شده و میزان پذیرش کلی افزایش یافت (Gümüsay et al, 2019; Nazir et al, 2016; Ding et al, 2005).

نتیجه‌گیری

از مهم‌ترین پارامترها در ارزیابی فراورده‌های غله صبحانه میزان سختی بافت پس از غوطه‌وری در شیر است که در این پژوهش بیشترین میزان آن در سطح ۳۰ درصد کنجاله کتان، رطوبت ۱۸ درصد و کمترین مقدار سرعت چرخش مارپیچ حاصل شد. بعد از غوطه‌ور کردن غله صبحانه در شیر با افزایش درصد کنجاله کتان به علت سخت‌تر شدن

منابع

- 1 AACC International Press. properties and sensory characteristics of rice-based expanded snacks. *Journal of Food engineering*, 66(3), pp.283-289.
- 2 AACC. (2000). Approved methods of the American association of cereal chemists. 10th ed. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists.
- 3 Adebawale, Y.A., Adeyemi, I. A. and Oshodi, A. A., (2005). Functional and physicochemical properties of flours of six Mucuna species. *African Journal of Biotechnology*, 4(12).
- 4 Ahmed, Z. S., (1999). Physico-chemical, structural and sensory quality of corn-based flax-snack. *Food/Nahrung*, 43(4), pp.253-258. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(19990801\)43:4<253::AID-FOOD253>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(19990801)43:4<253::AID-FOOD253>3.0.CO;2-3)
- 5 Alam, M.R., Scampicchio, M., Angeli, S. and Ferrentino, G., (2019). Effect of hot melt extrusion on physical and functional properties of insect based extruded products. *Journal of Food Engineering*, 259, pp.44-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.04.021>
- 6 Altan, A., McCarthy, K. L. and Maskan, M., (2008). Evaluation of snack foods from barley-tomato pomace blends by extrusion processing. *Journal of Food Engineering*, 84(2), pp.231-242. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.014>
- 7 Bekhit, A. E. D. A., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch, J., Teh, S., Ahmed, I. A. M., Al-Juhaimi, F. Y., Saeedi, P. and Bekhit, A. A., (2018). Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 13, pp.129-152. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.017>
- 8 Bisharat, G. I., Oikonomopoulou, V. P., Panagiotou, N. M., Krokida, M. K. and Maroulis, Z. B., (2013). Effect of extrusion conditions on the structural properties of corn extrudates enriched with dehydrated vegetables. *Food research international*, 53(1), pp.1-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.043>

- 9 Brennan, M. A., Lan, T. and Brennan, C. S., (2016). Synergistic effects of barley, oat and legume material on physicochemical and glycemic properties of extruded cereal breakfast products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(3), pp.405-413.
- 10 Brennan, M. A., Menard, C., Roudaut, G. and Brennan, C. S., (2012). Amaranth, millet and buckwheat flours affect the physical properties of extruded breakfast cereals and modulates their potential glycaemic impact. *Starch-Stärke*, 64(5), pp.392-398. <https://doi.org/10.1002/star.201100150>
- 11 Brennan, M. A., Merts, I., Monro, J., Woolnough, J. and Brennan, C. S., (2008). Impact of guar and wheat bran on the physical and nutritional quality of extruded breakfast cereals. *Starch-Stärke*, 60(5), pp.248-256. <https://doi.org/10.1002/star.200700698>
- 12 Brennan, M. A., Monro, J. A. and Brennan, C. S., (2008). Effect of inclusion of soluble and insoluble fibres into extruded breakfast cereal products made with reverse screw configuration. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(12), pp.2278-2288.
- 13 Carvalho, A. V., Mattietto, R. D. A., Bassinello, P. Z., Koakuzu, S. N., Rios, A. D. O., Maciel, R. D. A. and Carvalho, R. N., (2012). Processing and characterization of extruded breakfast meal formulated with broken rice and bean flour. *Food Science and Technology*, 32(3), pp.515-524. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000073>
- 14 Chassagne-Berces, S., Leitner, M., Melado, A., Barreiro, P., Correa, E. C., Blank, I., Gumy, J. C. and Chanvriat, H., (2011). Effect of fibers and whole grain content on quality attributes of extruded cereals. *Procedia Food Science*, 1, pp.17-23. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.004>
- 15 Cheewapramong, P., Riaz, M. N., Rooney, L. W. and Lusas, E. W., (2002). Use of partially defatted peanut flour in breakfast cereal flakes. *Cereal chemistry*, 79(4), pp.586-592. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.4.586>
- 16 Chronakis, I. S., (1998). On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(7), pp.599-637. <https://doi.org/10.1080/10408699891274327>
- 17 Colonna, P., Doublier, J. L., Melcion, J. P., De Monredon, F. and Mercier, C., (1984). Extrusion cooking and drum drying of wheat starch. I. Physical and macromolecular modifications. *Cereal Chemistry*, 61(6), pp.538-543.
- 18 Culbertson, J. D., (2004). Grain, cereal: ready-to-eat breakfast cereals. *Food processing: principles and applications*, pp.239-248.
- 19 da Silva, R. F. and Ascheri, J. L. R., (2009). Extrusion of broken rice for use as food ingredient. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12(1/4), pp.190-199.
- 20 de Mesa, N. J. E., Alavi, S., Singh, N., Shi, Y. C., Dogan, H. and Sang, Y., (2009). Soy protein-fortified expanded extrudates: Baseline study using normal corn starch. *Journal of Food Engineering*, 90(2), pp.262-270. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.032>
- 21 Ding, Q. B., Ainsworth, P., Tucker, G. and Marson, H., (2005). The effect of extrusion conditions on the physicochemical. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.019>
- 22 Doğan, H. and Karwe, M. V., (2003). Physicochemical properties of quinoa extrudates. *Food Science and Technology International*, 9(2), pp.101-114. <https://doi.org/10.1177/1082013203009002006>
- 23 dos Santos, P. A., Caliari, M., Júnior, M. S. S., Silva, K. S., Viana, L. F., Garcia, L. G. C. and de Lima, M. S., (2019). Use of agricultural by-products in extruded gluten-free breakfast cereals. *Food chemistry*, 297, p.124956. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124956>
- 24 Falcone, R. G. and Phillips, R. D., (1988). Effects of feed composition, feed moisture, and barrel temperature on the physical and rheological properties of snack-like products prepared from cowpea and sorghum flours by extrusion. *Journal of Food Science*, 53(5), pp.1464-1469.
- 25 Ferreira, S. M., Capriles, V. D. and Conti-Silva, A. C., (2021). Breakfast cereals with inulin obtained through thermoplastic extrusion: Chemical characteristics and physical and technological properties. *LWT*, 137, p.110390. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110390>
- 26 Garden-Robinson, J., (1993). Flaxseed gum: Extraction, characterization, and functionality (Doctoral dissertation, North Dakota State University).
- 27 Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S. and Sihag, M., (2014). Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of food science and technology*, 51(9), pp.1633-1653. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9>
- 28 Grand View Research, (2016). Europe and Asia Rice Noodles Market Analysis and Segments Forecasts to 2022. Grand View Research, Inc., p. 62. Report ID: 978-1-68038-777-3.
- 29 Gulati, P., Weier, S. A., Santra, D., Subbiah, J. and Rose, D. J., (2016). Effects of feed moisture and extruder screw speed and temperature on physical characteristics and antioxidant activity of extruded proso millet (*P Anicum Miliaceum*) flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(1), pp.114-122.

- 30 Gümüşay, Ö. A., Şeker, M. and Sadıkoğlu, H., (2019). Response surface methodology for evaluation of the effects of screw speed, feed moisture and xanthan gum level on functional and physical properties of corn half products. *LWT*, 111, pp.622-631. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.083>
- 31 Heywood, A. A., Myers, D. J., Bailey, T. B. and Johnson, L. A., (2002). Functional properties of low-fat soy flour produced by an extrusion-expelling system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12), p.1249.
- 32 Huang, J., Lui, W. B. and Peng, J., (2014). Effects of Screw Speed and Sesame Cake Level on Optimal Operation Conditions of Expanded Corn Grits Extrudates. *International Journal of Food Engineering*, 10(2), pp.317-328.
- 33 Ilo, S. and Berghofer, E., (1999). Kinetics of colour changes during extrusion cooking of maize grits. *Journal of Food Engineering*, 39(1), pp.73-80. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00148-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00148-4)
- 34 Jacques-Fajardo, G. E., Prado-Ramírez, R., Arriola-Guevara, E., Carrillo, E. P., Espinosa-Andrews, H. and Morales, G. M. G., (2017). Physical and hydration properties of expanded extrudates from a blue corn, yellow pea and oat bran blend. *LWT*, 84, pp.804-814. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.046>
- 35 Jaya, Dhungana, and P. K. Poudel. "Formulation and quality evaluation of maize-rice-defatted flaxseed blend extruded product." In Food Science and Technology for Agro-entrepreneurship Development. 7th National Conference of Food Science & Technology (Food Conference-2014), 13-14 June 2014, Kathmandu, Nepal, pp. 127-138. Nepal Food Scientists and Technologists Association (NEFOSTA), 2014.
- 36 Jozinović, A., Šubarić, D., Ačkar, Đ., Babić, J. and Miličević, B., (2016). Influence of spelt flour addition on properties of extruded products based on corn grits. *Journal of Food Engineering*, 172, pp.31-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.012>
- 37 Kaur, P., Sharma, P., Kumar, V., Panghal, A., Kaur, J. and Gat, Y., (2019). Effect of addition of flaxseed flour on phytochemical, physicochemical, nutritional, and textural properties of cookies. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18(4), pp.372-377. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.12.004>
- 38 Kaur, P., Waghmare, R., Kumar, V., Rasane, P., Kaur, S. and Gat, Y., (2018). Recent advances in utilization of flaxseed as potential source for value addition. *OCL*, 25(3), p.A304.
- 39 Koca, A.F. and Anil, M., (2007). Effect of flaxseed and wheat flour blends on dough rheology and bread quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), pp.1172-1175. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2739>
- 40 Kumari, R., Singh, K., Singh, R., Bhatia, N. and Nain, M. S., (2019). Development of healthy ready-to-eat (RTE) breakfast cereal from popped pearl millet. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 89(5), pp.877-81.
- 41 Larrea, M. A., Chang, Y. K. and Bustos, F. M., (2005). Effect of some operational extrusion parameters on the constituents of orange pulp. *Food Chemistry*, 89(2), pp.301-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.037>
- 42 Lazou, A. and Krokida, M., (2010). Functional properties of corn and corn-lentil extrudates. *Food Research International*, 43(2), pp.609-616. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.017>
- 43 Lazou, A. and Krokida, M., (2011). Thermal characterisation of corn-lentil extruded snacks. *Food Chemistry*, 127(4), pp.1625-1633. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.029>
- 44 Liu, Y., Hsieh, F., Heymann, H. and Huff, H. E., (2000). Effect of process conditions on the physical and sensory properties of extruded oat-corn puff. *Journal of food science*, 65(7), pp.1253-1259.
- 45 Machado, M. F., Oliveira, F. A. and Cunha, L. M., (1999). Effect of milk fat and total solids concentration on the kinetics of moisture uptake by ready-to-eat breakfast cereal. *International journal of food science & technology*, 34(1), pp.47-57.
- 46 Manjula, B. and Visvanathan, R., (2014). Process optimisation of extruded breakfast cereal from rice mill brokens-finger millet-maize flour blends. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 3(4), p.66.
- 47 Marpalle, P., Sonawane, S. K. and Arya, S. S., (2014). Effect of flaxseed flour addition on physicochemical and sensory properties of functional bread. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), pp.614-619. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.003>
- 48 Medina, W. T., Quevedo, R. A. and Aguilera, J. M., (2013). Changes on image texture features of breakfast flakes cereals during water absorption. *Food science and technology international*, 19(1), pp.45-57. <https://doi.org/10.1177/1082013212442182>
- 49 Meng, X., Threinen, D., Hansen, M. and Driedger, D., (2010). Effects of extrusion conditions on system parameters and physical properties of a chickpea flour-based snack. *Food Research International*, 43(2), pp.650-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.016>
- 50 Mesquita, C. D. B., Leonel, M. and Mischán, M. M., (2013). Effects of processing on physical properties of extruded snacks with blends of sour cassava starch and flaxseed flour. *Food Science and Technology*, 33(3), pp.404-410. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000073>
- 51 Moraru, C. I. and Kokini, J. L., (2003). Nucleation and expansion during extrusion and microwave heating of cereal foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(4), pp.147-165. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00020.x>

- 52 Nazir, F., Naik, H. R. and Hussain, S. Z., (2016). Effect of extrusion conditions and apricot powder incorporation on colour parameters of rice based breakfast snacks. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(3), pp.1673-1678.
- 53 O'shea, N., Arendt, E. and Gallagher, E., (2014). Enhancing an extruded puffed snack by optimising die head temperature, screw speed and apple pomace inclusion. *Food and bioprocess technology*, 7(6), pp.1767-1782. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1181-x>
- 54 Oliveira, L. C., Alencar, N. M. and Steel, C. J., (2018). Improvement of sensorial and technological characteristics of extruded breakfast cereals enriched with whole grain wheat flour and jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel. *LWT*, 90, pp.207-214. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.017>
- 55 Oliveira, L. C., Rosell, C. M. and Steel, C. J., (2015). Effect of the addition of whole-grain wheat flour and of extrusion process parameters on dietary fibre content, starch transformation and mechanical properties of a ready-to-eat breakfast cereal. *International journal of food science & technology*, 50(6), pp.1504-1514.
- 56 Oliveira, L. C., Schmiele, M. and Steel, C. J., (2017). Development of whole grain wheat flour extruded cereal and process impacts on color, expansion, and dry and bowl-life texture. *LWT*, 75, pp.261-270. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.064>
- 57 Onwulata, C. I. and Konstance, R. P., (2006). Extruded corn meal and whey protein concentrate: effect of particle size. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(4), pp.475-487.
- 58 Pansawat, N., Jangchud, K., Jangchud, A., Wuttijumnong, P., Saalia, F. K., Eitenmiller, R. R. and Phillips, R. D., (2008). Effects of extrusion conditions on secondary extrusion variables and physical properties of fish, rice-based snacks. *LWT-Food Science and Technology*, 41(4), pp.632-641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.05.010>
- 59 Pardhi, S. D., Singh, B., Nayik, G. A. and Dar, B. N., (2019). Evaluation of functional properties of extruded snacks developed from brown rice grits by using response surface methodology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18(1), pp.7-16. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.006>
- 60 Perdon, A. A., Poutanen, K. S. and Schonauer, S. L., (2020). Breakfast cereals and how they are made-Introduction. In *Breakfast Cereals and How They Are Made* (pp. 1-4). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812043-9.00001-1>
- 61 Ravindran, G., Carr, A. and Hardacre, A., (2011). A comparative study of the effects of three galactomannans on the functionality of extruded pea-rice blends. *Food Chemistry*, 124(4), pp.1620-1626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.030>
- 62 Rhee, K. S., Kim, E.S., Kim, B. K., Jung, B. M. and Rhee, K. C., (2004). Extrusion of minced catfish with corn and defatted soy flours for snack foods. *Journal of food processing and preservation*, 28(4), pp.288-301.
- 63 Riaz, M. N. and Rokey, G. J., (2011). Impact of protein, starch, fat and fiber on extruded foods and feeds. *Extrusion problems solved*, pp.43-53.
- 64 Rosentrater, K. A., Muthukumarappan, K., and Kannadhasan, S. (2009). Effects of ingredients and extrusion parameters on aquafeeds containing DDGS and potato starch. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 1(1): 22-38.
- 65 Rudra, S. G., Jakhar, N., Nishad, J., Saini, N., Sen, S., Bhardhwaj, R., Jaiswal, S., Suneja, P., Singh, S. and Kaur, C., (2015). Extrusion conditions and antioxidant properties of sorghum, barley and horse gram based snack. *Vegetos-An International Journal of Plant Research*, 28(2), pp.171-182.
- 66 Selani, M. M., Brazaca, S. G. C., dos Santos Dias, C. T., Ratnayake, W. S., Flores, R. A. and Bianchini, A., (2014). Characterisation and potential application of pineapple pomace in an extruded product for fibre enhancement. *Food chemistry*, 163, pp.23-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.076>
- 67 Sen, S., Chakraborty, R. and Kalita, P., (2020). Rice-not just a staple food: A comprehensive review on its phytochemicals and therapeutic potential. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.022>
- 68 Sharma, C., Singh, B., Hussain, S.Z. and Sharma, S., (2017). Investigation of process and product parameters for physicochemical properties of rice and mung bean (*Vigna radiata*) flour based extruded snacks. *Journal of food science and technology*, 54(6), pp.1711-1720. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2606-8>
- 69 Silva, PA, Assis, GT, Carvalho, AV and Simões, MG, (2011). Development and characterization of extruded cassava breakfast cereal enriched with whey protein concentrate. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14 (4), pp.260-266.
- 70 Singh, B., Sekhon, K. S. and Singh, N., (2007). Effects of moisture, temperature and level of pea grits on extrusion behaviour and product characteristics of rice. *Food chemistry*, 100(1), pp.198-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.042>
- 71 Singh, R. R., Majumdar, R. K. and Venkateshwarlu, G., (2014). Optimum extrusion-cooking conditions for improving physical properties of fish-cereal based snacks by response surface methodology. *Journal of food science and technology*, 51(9), pp.1827-1836. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0725-9>
- 72 Strahm, B., (1998). Fundamentals of polymer science as an applied extrusion tool. *Cereal Foods World*, 43(8), pp.621-625.

- 73 Walter, M., Marchezan, E. and de Avila, L.A., (2008). Rice: composition and nutritional characteristics. *Ciência Rural*, 38(4), pp.1184-1192.
- 74 Wani, S.A. and Kumar, P., (2016). Development and parameter optimization of health promising extrudate based on fenugreek oat and pea. *Food bioscience*, 14, pp.34-40. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.02.002>
- 75 Wójtowicz, A., Kolasa, A. and Mościcki, L., (2013). Influence of buckwheat addition on physical properties, texture and sensory characteristics of extruded corn snacks. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(4), pp.239-244.
- 76 Wójtowicz, A., Mitrus, M., Oniszczyk, T., Mościcki, L., Kręcis, M. and Oniszczyk, A., (2015). Selected physical properties, texture and sensory characteristics of extruded breakfast cereals based on wholegrain wheat flour. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 7, pp.301-308. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.12.051>
- 77 Wootton, M. and Bamunuarachchi, A., (1978). Water binding capacity of commercial produced native and modified starches. *Starch-Stärke*, 30(9), pp.306-309. <https://doi.org/10.1002/star.19780300905>
- 78 Wu, M., Li, D., Wang, L.J., Özkan, N. and Mao, Z. H., (2010). Rheological properties of extruded dispersions of flaxseed-maize blend. *Journal of Food Engineering*, 98(4), pp.480-491. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.031>
- 79 Yadav, D. N., Anand, T. and Singh, A. K., (2014). Co-extrusion of pearl millet-whey protein concentrate for expanded snacks. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(3), pp.840-846.
- 80 Yağcı, S. and Göğüş, F., (2008). Response surface methodology for evaluation of physical and functional properties of extruded snack foods developed from food-by-products. *Journal of Food Engineering*, 86(1), pp.122-132. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.09.018>
- 81 Yaman, M., Sargin, H. S. and Mızrak, Ö. F., (2019). Free sugar content, in vitro starch digestibility and predicted glycemic index of ready-to-eat breakfast cereals commonly consumed in Turkey: An evaluation of nutritional quality. *International journal of biological macromolecules*, 135, pp.1082-1087. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.037>



Effect of batch dryer with agitator and moisture controller on drying paddy and milling factor

Asefeh Latifi^{*1}, Mohammadali Kiehbardrouninezhad², Mohamadreza Alizadeh³

Received: 2021.06.27

Revised: 2021.11.06

Accepted: 2021.11.16

Available Online: 2021.11.16

How to cite this article:

Latifi, A., Kiehbardrouninezhad, M., Alizadeh, M. (2022). Effect of batch dryer with agitator and moisture controller on drying paddy and milling factor. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 648-656.

Abstract

Introduction: Non-uniformity of dried paddy using conventional batch type dryer is one of the important factors on rice breakage and losses in milling operations in Iran. For optimizing drying process, a laboratory batch type paddy dryer with agitator and automatic moisture controller was designed and fabricated. The performance of the dryer was evaluated after fabrication.

Materials and Methods: The experimental variables were dryer type in two levels (batch dryer with agitator and batch dryer without agitator) and paddy variety in four levels (Hashemi, Gohar, Tarom and Shirodi). The time of drying, drying rate, milling yield, head rice yield, track percentage and whiteness, was conducted in factorial layout based on completely randomized design with three replications.

Results and Discussion: The results obtained revealed that the drying time from initial paddy moisture content (average of 14.2 %) to final moisture content (about 8.5 %) lasted about 14.2 h and 43.1 h in batch dryer with and without agitator, respectively. The average drying rate in batch dryer without agitator for all varieties was $0.135\% \cdot h^{-1}$ and that of the batch dryer with agitator was $0.412\% \cdot h^{-1}$. There was a significant effect of dryer type on milling recovery and head rice yield ($P < 0.01$) of different variety ($P < 0.05$). The highest milling recovery and head rice yield was determined in Hashemi (69.16 and 87.66 %, respectively) and the lowest corresponding values were registered in Shirodi (62.16 and 57.83 %, respectively). The head rice yield in batch dryer without and with agitator was found to be 67.91 % and 73.16 %, respectively. There was non-significant difference between percentages of track in two types of dryers. The rice whiteness of Hashemi variety dried with batch dryer with agitator (50.46 %) was significantly ($P < 0.01$) higher than the rice whiteness in batch dryer without agitator (46.10 %), however there was non-significant difference between the means of rice whiteness in the other paddy varieties in the two tested dryers.

Fabrication and installation of dryer with agitator and automatic moisture controller has benefit of saving time of drying to one third and increasing head rice yield to 5% compare with traditional paddy dryer.

Keywords: Paddy dryer, Drying rate, Head rice yield, Whiteness.

1. PhD, Department of food science and technology, Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Mazandaran branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Amol, Iran.

2. Graduate researcher, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada.

3. PhD, Department of agricultural Machinery, Associate Professor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

(*Corresponding Author Email: asefeh59@yahoo.com)

DOI: [10.22067/ifstrj.2021.71130.1068](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.71130.1068)

مقاله علمی-پژوهشی

تأثیر استفاده از خشک کن خوابیده همزن دار با سیستم کنترل رطوبت بر فرایند خشک کردن شلتوک و فاکتورهای تبدیل

عاصفه لطیفی^{۱*} - محمدعلی کیه بادرودی نژاد^۲ - محمدرضا علیزاده^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵

چکیده

غیریکتواختی در خشک کردن شلتوک با استفاده از خشک کن بستر خوابیده متداول در کارخانه های شالیکوبی یکی از عوامل مؤثر بر افزایش درصد شکستگی برنج و ضایعات در مرحله تبدیل محسوب می شود. به منظور بهینه سازی فرایند خشک کردن، یک دستگاه خشک کن بستر خوابیده مجهز به همزن و سیستم کنترل خودکار رطوبت شلتوک در مقیاس آزمایشگاهی طراحی و ساخته شد و کارایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. متغیرهای آزمایش، نوع خشک کن در دو سطح (مجهز به همزن و سیستم کنترل رطوبت (خشک کن هوشمند) و بدون همزن (رایج)) و نوع شلتوک در چهار سطح (طارم هاشمی، گوهر، طارم محلی و شیرودی) بودند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد، زمان خشک کردن شلتوک از رطوبت ۱۴/۲ درصد به رطوبت ۸/۵ درصد در خشک کن رایج به طور میانگین ۴۳/۱ ساعت و با خشک کن هوشمند ۱۴/۲ ساعت به طول انجامید. میانگین نرخ خشک کردن برای چهار رقم در خشک کن خوابیده ۰/۱۳۵ و در خشک کن هوشمند ۰/۴۱۲ درصد بر ساعت بوده است. اثر رقم بر راندمان تبدیل و راندمان برنج سالم ($p < 0.01$) و اثر نوع خشک کن بر راندمان برنج سالم ($p < 0.05$) معنی دار بود. بیشترین راندمان تبدیل و راندمان برنج سالم در رقم هاشمی (به ترتیب ۶۹/۲ و ۸۷/۷ درصد) و کمترین آن در رقم شیرودی (به ترتیب ۶۲/۲ و ۵۷/۸ درصد) به دست آمد. راندمان برنج سالم در خشک کن رایج به طور میانگین ۶۷/۹ درصد و در خشک کن هوشمند ۷۳/۲ درصد تعیین شد. نوع خشک کن تأثیر معناداری بر سفیدی رنگ ارقام نداشت. از بین چهار رقم فقط طارم هاشمی سفیدی رنگ بیشتری در خشک کن هوشمند نشان داد.

واژه های کلیدی: خشک کن شلتوک، درجه سفیدی، راندمان برنج سالم، نرخ خشک کردن

مقدمه

مرحله ای بحرانی محسوب می شود. زیرا طبق تحقیقات انجام شده، مهمترین عامل ضایعات غلات، ناشی از خشک کردن نادرست آنها است (Brooker et al., 1992). طبق نظر Battacharya (۱۹۸۰) عواملی که باعث ایجاد ضایعات طی عملیات تبدیل شلتوک به برنج سفید می شوند را می توان به دو عامل دستگاهی و رقمی (مربوط به محصول) تقسیم بندی نمود. این دو عامل مستقل از یکدیگر نبوده و هر یک بر دیگری تأثیرگذار می باشند (Battacharya, 1980). شلتوک برنج به عنوان یک ماده بیولوژیک حساس به حرارت، نسبت به عملیات خشک کردن از خود واکنش نشان می دهد و دچار تغییرات کیفی همچون ترک خوردگی و کاهش عطر و طعم می شود (Zheng and Lan, 2007). Fan و همکاران (۲۰۰۰) اثرات رطوبت زمان برداشت، رقم و شرایط

شلتوک در فصل برداشت رطوبتی بین ۱۸-۲۶ درصد دارد. برای جلوگیری از فساد باید رطوبت آن کم شود تا بدین وسیله تنفس کاهش یابد و فعالیت کپک ها محدود شود. برای نگهداری طولانی مدت رطوبت شلتوک باید به حداقل ۱۴٪ و برای تبدیل به برنج سفید به ۱۱٪ برسد (Hall, 1970). ضایعات مربوط به عملیات تبدیل شلتوک به برنج سفید بخش قابل توجهی از ضایعات برنج در فرآیند پس از برداشت را تشکیل می دهد. عواملی مانند روش های خشک کردن، نوع سیستم تبدیل و تنظیمات آن ها، خصوصیات فیزیکی و مکانیکی محصول (رقم) از جمله مواردی هستند که نقش به سزایی بر کیفیت تبدیل شلتوک ایفاء می نمایند. در چرخه تولید محصولات کشاورزی و غذایی، خشک کردن

۳- محمدرضا علیزاده، دکتری ماشین آلات کشاورزی، هیات علمی موسسه تحقیقات برنج کشور.

* نویسنده مسئول: Email: asefeh59@yahoo.com

DOI: 10.22067/ifstrj.2021.71130.1068

۱- دکتری صنایع غذایی، هیات علمی موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

۲- دکتری مهندسی مکانیک بیوسیستم-انرژی های تجدیدپذیر، محقق گروه برق و کامپیوتر دانشگاه دالهوری کانادا.

خشک کردن با هوای گرم را بر کاهش درصد برنج سفید سالم ارقام دانه بلند و متوسط بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنان نشان داد که رقم، رطوبت دانه در زمان برداشت، نحوه و مدت زمان خشک کردن اثرات معنی داری بر کاهش درصد برنج سفید سالم داشته است (Fan et al., 2000). Rigor و Mondoza (۱۹۸۳) اثر توأم دما و زمان خشک کردن را بر ترک خوردگی دانه مورد بررسی قرار دادند و اعلام نمودند که دما و زمان خشک کردن بیشترین اثر را بر ترک خوردگی دانه نسبت به سایر پارامترها همچون سرعت هوا، رقم شلتوک و رطوبت اولیه محصول دارند (Mondoza and Rigor, 1983). Zhang و همکاران (۲۰۰۲) در تحقیقات خود نشان دادند، مقاومت و انرژی شکست دانه با کاهش محتوای رطوبت به صورت خطی افزایش پیدا می کند (Zhang et al., 2002). طی این بررسی مشخص شد که مهمترین عامل تاثیرگذار بر شکنندگی دانه، دما و در مرحله بعدی رطوبت نهایی محصول می باشد. Kent (۱۹۸۲) طی تحقیقات خود نشان داد، میزان مطلوب خشک شدن دانه به نوع رقم، رطوبت اولیه و درجه حرارت دانه، درجه حرارت محیط، رطوبت نسبی و روش خشک کردن بستگی دارد (Kent, 1982). چنانچه رطوبت سطحی سریعاً کاهش یابد، به دلیل انتقال آب از بخش های داخلی دانه به سطح آن، لایه های بیرونی چروکیده و منقبض شده و در اثر به کارگیری درجه حرارت بالا طی عملیات خشک کردن، انبساط ناشی از فشار درونی با رطوبت های مختلف باعث افزایش شکستگی در فرآیند تبدیل، به ویژه طی عملیات سفید کردن می گردد.

تحقیقات آکادمیک زیادی در مورد انواع خشک کن ها از جمله بستر سیال، مادون قرمز، ماکروویو و انواع خشک کن های گردشی صورت گرفته است و دماهای مختلف خشک کردن از ۳۰ تا ۱۵۰ درجه بسته به نوع خشک کن و رطوبت اولیه شلتوک استفاده شده و تاثیر آنها بر راندمان برنج سفید و کیفیت مورد بررسی قرار گرفته است (Aquerreta et al., 2007; Iguaz et al., 2006; Pan et al., 2008). Mehdi zadeh و Zomorrodian (۲۰۰۸) از خشک کن خورشیدی آزمایشگاهی لایه نازک برای خشک کردن شلتوک در دمای ۵۰ درجه و مقایسه آن با خشک کردن به روش طبیعی در آفتاب استفاده نمودند. نتایج حاکی از کاهش چشمگیر زمان خشک کردن و عدم تاثیر بر فاکتورهای تبدیل و سفیدی رنگ بیشتر در خشک کن خورشیدی بود (Mehdi zadeh and Zomorrodian, 2008). Tahmasbi و همکاران (۲۰۰۸) خشک کن شلتوک با سینی لرزان آزمایشگاهی را طراحی و شرایط خشک کردن شلتوک در آن را در مقایسه با خشک کن ستونی مقایسه نمودند. با وجود کاهش چشمگیر زمان خشک کردن در خشک کن سینی لرزان، درصد شکستگی در آن بالا بود که بیان شده بود با کنترل نحوه لرزش سینی می توان میزان شکستگی را کاهش داد (Tahmasbi et al., 2008).

خشک کن های کاربردی در صنعت برنج در ایران همچنان خشک کن های مخزنی یا بستر ثابت خوابیده و تا حد کمتری خشک کن های ایستاده جریان گردشی می باشند. خشک کن های بستر خوابیده متداول دارای ظرفیت های متفاوت از ۳ تا ۶ تن می باشند که شلتوک تا عمق حدود یک متر در مخزن بارگیری می شود و هوای گرم ورودی از زیر صفحه مشبک به داخل مخزن شلتوک دمیده می شود. کاهش بیش از حد رطوبت شلتوک در این سیستم ها عامل مهمی در افزایش ضایعات محسوب می شود. از آنجایی که معیار پایان عملیات خشک کردن در این نوع خشک کن ها، رطوبت دانه های مستقر در لایه های سطحی خشک کن می باشد، لذا اپراتورها برای رساندن رطوبت شلتوک به محدوده مورد نظر، در مرحله پایانی عملیات خشک کردن، درجه حرارت خشک کن را افزایش می دهند. افزایش درجه حرارت در این مرحله باعث می شود، شلتوک های مستقر در لایه های پائینی خشک تر از شلتوک های مستقر در لایه های بالایی باشند (Tajadoditalab, 2010). خشک شدن بیش از حد سبب ایجاد ترک در دانه شده و این ترک ها مقاومت دانه به شکست را به طور قابل توجهی کاهش می دهند (Siebenmorgen et al., 2005). اگرچه کاهش عمق شلتوک در مخزن تا ۴۰ سانتی متر و یا کنترل دبی و دمای هوای ورودی از روش های کاهش تنش وارده بر دانه در این روش محسوب می شود (Sabori, 2001)، ولی در اغلب کارخانه های شالیکوبی کنترل دقیقی بر فرایند خشک کردن در خشک کن های بستر خوابیده وجود ندارد و این امر موجب کاهش راندمان خشک کن و افزایش درصد شکستگی برنج در مرحله تبدیل می شود.

انواع خشک کن های جریان گردشی برای بهبود عملیات خشک کردن و تبدیل نیز طراحی شده است. استفاده از خشک کن جریان گردشی سبب یکنواختی عملیات خشک کردن می شود (Kocsis et al., 2011). Gazor و Moumeni (۲۰۱۹) فرایند خشک کردن و کیفیت تبدیل شلتوک رقم طارم را در دو نوع خشک کن جریان گردشی و بستر خوابیده رایج مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق مورد نظر درصد شکستگی دانه در خشک کن جریان گردشی ۵٪ کمتر از خشک کن رایج خوابیده و زمان خشک شدن نیز به نصف کاهش یافته بود (Moumeni and Gazor, 2019). Gharnasi Gharavi و همکاران (۲۰۱۷) فرایند خشک کردن در یک خشک کن آزمایشگاهی دوار را با استفاده از روش سطح پاسخ بر اساس کمترین زمان خشک کردن و کمترین میزان درصد شکستگی و ترک در دامنه مختلف دمایی از ۴۰ تا ۸۰ درجه، سرعت های چرخش مختلف و میزان پر بودن مخزن بهینه نمودند (Gharnasi Gharavi et al., 2017). بر این اساس دمای ۵۶ درجه، سرعت چرخش استوانه ۱۰ دور بر دقیقه و میزان پر بودن استوانه ۵۴ درصد به دست آمد. البته در تحقیق آنها به رطوبت اولیه شلتوک ورودی

شد و مراحل خشک کردن شلتوک‌ها در هر دو خشک کن در دمای $2 \pm$ ۴۰ درجه سانتی گراد تا رسیدن به رطوبت تقریبی ۸/۵ درصد ادامه یافت.

مشخصات فنی خشک کن بستر خوابیده مجهز به همزن (هوشمند)

قسمت‌های مختلف خشک کن بستر خوابیده مجهز به همزن شامل مخزن خشک کن، همزن‌ها، موتور راه انداز همزن‌ها، صفحه مشبک، سیستم حرارتی، سیستم انتقال مواد و حسگرها می‌باشند که در زیر در هر مورد به‌طور خلاصه شرح داده می‌شود. خشک کن سنتی همین سیستم بدون همزن و سنسورها می‌باشد (شکل ۱).

بدنه خشک کن

بدنه خشک کن مورد آزمایش از جنس ورقه‌های PVC ساخته شده است. این ورقه‌ها به دلیل سبک بودن، استحکام، قیمت و عایق حرارتی مناسب دارای مزایایی نسبت به دیگر ورقه‌ها همچون چوب و آهن می‌باشد. ورقه‌های PVC از چند لایه متصل به یکدیگر تشکیل شده‌اند.

همزن‌ها

به منظور انتقال حرارتی یکنواخت داخل خشک کن و لایه‌های شلتوک، از همزن استفاده شده است. حرارت از قسمت پایین محفظه خشک کن بستر خوابیده و توسط فن به قسمت‌های زیرین توده شلتوک دمیده می‌شود. همزن‌ها در سه محور عرضی وظیفه زیر و رو کردن و جابه‌جا کردن توده شلتوک‌های لایه زیرین و انتقال آن را به قسمت بالا و برعکس را انجام می‌دهند. جنس این همزن‌ها که با آرایش خاصی نسبت به هم بر روی سه محور عرضی قرار گرفته‌اند، از صفحات پلی اتیلن وینیل بوده که این صفحات دارای منافذی بین لایه‌های تشکیل دهنده آن می‌باشد و در هنگام تماس با توده شلتوک و قرار گرفتن در دمای بالا به دلیل ساختمان خاص و مقاوم آن نسبت به ضربه و حرارت بالا، سبب آسیب رساندن به دانه شلتوک نمی‌شود. از دیگر مزایای این نوع ورقه‌ها می‌توان به انعطاف‌پذیری بالا و استحکام ضربه‌ای مناسب آن اشاره کرد. این همزن‌ها درون محورهایی توخالی و در حال چرخش قرار گرفته‌اند و با استفاده از لوله‌هایی، هوای گرم پایین مخزن را به درون این محورها منتقل کرده و هوای گرم پس از جریان یافتن در سرتاسر این محور به درون همزن‌ها گسترش می‌یابد و از طریق آن به لایه‌های شلتوک هدایت می‌شود تا به انتقال حرارت و خشک شدن یکنواخت شلتوک کمک کند.

موتور راه‌انداز همزن‌ها

اشاره نشد زیرا به‌دست آوردن دمای مناسب در خشک کردن تک مرحله‌ای شلتوک وابستگی زیادی به رطوبت اولیه آن دارد. هرچه رطوبت اولیه رقمی بالاتر باشد حساسیت به دمای بالا در خشک کردن بیشتر می‌شود که علت آن عبور مکرر از منحنی دمای انتقال شیشه‌ای است. محدوده دمایی امن برای خشک کردن یک مرحله‌ای دمای زیر ۵۰ درجه می‌باشد. از اینرو کارخانه‌های شالیکوبی داخل کشور نیز به طور تجربی از دمای ۳۰ تا ۵۵ درجه استفاده می‌نمایند (Latifi, 2011). Alizadeh و Gazor (۲۰۲۰) نیز تأثیر خشک کن دوار بر خشک کردن شلتوک رقم هاشمی را در مقایسه با خشک کن خوابیده بررسی نمودند. در تحقیق آنها بیان شده بود به دلیل پایین بودن رطوبت اولیه نمونه‌ها تغییر چندانی در زمان خشک کردن در خشک کن دوار نسبت به خوابیده بوجود نیامده بود و پیش‌بینی شده بود در صورت بالا بودن رطوبت اولیه شلتوک، زمان در خشک کن دوار کاهش می‌یافت. با این حال درصد شکستگی در خشک کن دوار ۷٪ کمتر شده بود (Alizadeh and Gazor, 2020).

در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی خشک کن بستر خوابیده متداول در کارخانه‌های شالیکوبی، از پاروهای (همزن) با طرح خاص برای بهم زدن شلتوک استفاده شده است، تا از این طریق ضمن کاهش مدت زمان خشک کردن (افزایش نرخ خشک کنی)، یکنواختی در خشک کردن محصول را افزایش داد. علاوه بر این، جابجایی شلتوک در مخزن به گونه‌ای انجام شود که ضمن هم‌زدن یکنواخت محصول، آسیب‌های مکانیکی وارد بر دانه نیز به حداقل برسد. لذا این تحقیق با هدف ارزیابی کارایی دو نوع خشک کن بستر خوابیده بدون همزن (رایج) و خشک کن خوابیده مجهز به همزن و سیستم کنترل رطوبت (هوشمند) از نظر مدت زمان و نرخ خشکاندن شلتوک، خواص تبدیل و درجه سفیدی مورد اجرا قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۳ در مؤسسه تحقیقات برنج کشور معاونت مازندران انجام شد. شلتوک مورد نیاز شامل ارقام محلی (طارم هاشمی و طارم محلی) و اصلاح شده (گوهر و شیرودی) به مقدار ۱۰۰ کیلوگرم از هر رقم از مؤسسه تحقیقات برنج تهیه شد. قبل از انجام آزمایش، کلیه ناخالصی‌ها با استفاده از بوجار شلتوک جدا شد. رطوبت اولیه شلتوک با استفاده از رطوبت‌سنج غلات (MK303، کره جنوبی) تعیین گردید. بر این اساس، رطوبت اولیه شلتوک برای ارقام شیرودی، طارم، هاشمی و گوهر به ترتیب ۱۴/۲، ۱۴/۶، ۱۴/۳ و ۱۴ درصد بر پایه تر بود. شلتوک هر رقم به دو قسمت تقسیم شد و یک قسمت آن برای خشک کن بستر خوابیده رایج و قسمت دیگر برای خشک کن بستر خوابیده مجهز به همزن و کنترل رطوبت (هوشمند) در نظر گرفته

محور عرضی توخالی دمیده و سپس از طریق همزن ها به لایه های شلتوک منتقل می شود.

سیستم انتقال مواد

در روش سنتی پس از خشک شدن شلتوک کارگران با پارو چوبی و دیگر وسایل اقدام به تخلیه از خشک کن می نمایند که این عمل منجر به آسیب رساندن به شلتوک ها و افزایش ضایعات برنج می شود. همچنین احتمال مخلوط شدن ناخالصی ها مانند سنگ و کلوخ با شلتوک وجود دارد. در خشک کن بستر خوابیده مجهز به همزن، با باز کردن دریچه قسمت پشتی مخزن و همزمان با چرخش همزن، شلتوک به بیرون از مخزن تخلیه می شود.

حسگرها

در این نوع خشک کن از سه نوع حسگر رطوبت، دما و اولتراسونیک استفاده شده است. میزان رطوبت شلتوک درون مخزن با استفاده از سه عدد حسگر رطوبت سنخ خازنی سه میکرو فارادی اندازه گیری شده است که به شکل مثلثی داخل این دستگاه نصب شده است. همچنین دمای شلتوک درون دستگاه نیز با استفاده از شش عدد سنسور مقاومتی ۱۲ اهمی که به شکل ستاره ای درون این دستگاه نصب گردیده، اندازه گیری شده است.

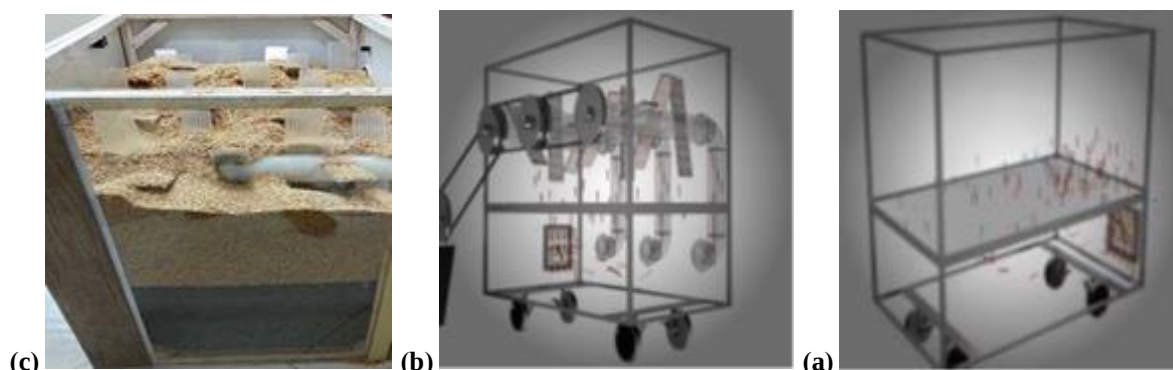
جهت راه اندازی و به حرکت درآوردن سه محور عرضی همزن ها از یک موتور جعبه دنده ای تک فاز با توان چهار اسب بخار استفاده شده است. این موتور با استفاده از تسمه و پولی به محور همزن ها متصل شده است و موجب به حرکت درآوردن این محورها با سرعت گردشی می شود. سرعت چرخشی خروجی محور همزن ها دو دور بر دقیقه لحاظ شده است.

صفحه مشبک

هوای گرم از محفظه زیرین خشک کن بستر خوابیده از صفحه مشبک فلزی دو میلی متری عبور کرده و با جریان آن به سمت بالا از بین لایه های شلتوک داخل مخزن عبور می کند همچنین در خشک کن مجهز به همزن، علاوه بر جریان هوا از زیر صفحه مشبک، هوای گرم از طریق سوراخ هایی که در دیواره محور تو خالی ایجاد شده است، به هنگام زیر و رو کردن شلتوک ها به داخل توده شلتوک جریان می یابد.

سیستم حرارتی

برای گرم کردن محفظه زیر خشک کن از ۴ المنت میله ای که توان هر کدام ۷۰۰ وات بود، استفاده شده است که با استفاده از یک فن صنعتی ۱۴×۱۴ سانتی متر و ۱۲۰۰ دور بر دقیقه هوای گرم به سرتاسر زیر خشک کن بستر خوابیده دمیده می شود. همچنین، با استفاده از سه دمنده، هوای گرم به طور یکنواخت و با سرعت یکسان به داخل هر سه



شکل ۱- نحوه عبور جریان هوای گرم از خشک کن رایج (a)، از خشک کن هوشمند (b) و خشک کن هوشمند با شلتوک (c)

Fig. 1. Passing of warm weather through tradition dryer (a) intelligence dryer (b) intelligence dryer with paddy (c)

تکرار ۲۵۰ گرمی انجام گرفت. آزمون ها شامل اندازه گیری درصد راندمان تبدیل که نسبت وزن برنج سفید به وزن شلتوک (Soponronnarit et al., 2008)، درصد راندمان برنج سالم که شامل وزن برنج سفید سالم به وزن کل برنج سفید بود و درجه سفیدی با سفیدی سنخ Whitnness Tester Kett C₁₀₀ ژاپن که سفیدی جسم استاندارد را ۸۷/۳ نشان می دهد، اندازه گیری شد.

پارامترهای اندازه گیری شده

مدت زمان خشک شدن شلتوک تا رسیدن به رطوبت مورد نظر و نرخ خشک شدن شلتوک (آهنگ کاهش رطوبت در ساعت های مختلف خشک کردن بر حسب درصد کاهش رطوبت بر ساعت) بررسی شد. تبدیل شلتوک ها به برنج سفید توسط دستگاه پوست کن غلطک لاستیکی و سفیدکن سایشی آزمایشگاهی مارک ساتاکه ژاپن در سه

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات تبدیل و کیفی به ترتیب در **جدول ۱** و **۲** آمده است. مطابق **جدول ۱** اثر رقم بر راندمان تبدیل معنادار شد. بالاترین راندمان تبدیل مربوط به رقم طارم هاشمی و کمترین مربوط به رقم شیروودی بود (**جدول ۲**). راندمان تبدیل ارقام تا حدود زیادی وابسته به نوع رقم و خصوصیات فیزیکی آن می باشد و عوامل محیطی از قبیل درجه حرارت و رطوبت تبدیل تا حدی تاثیر گذارند (Alizadeh and Habibi, 2016).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

به منظور بررسی عملکرد و کارایی خشک کن بستر خوابیده متداول و مقایسه آن با خشک کن هوشمند، آزمایشی به صورت فاکتوریل با دو فاکتور رقم در چهار سطح (دو رقم محلی طارم هاشمی و طارم محلی و دو رقم اصلاح شده گوهر و شیروودی) و نوع خشک کن در دو سطح (رایج و هوشمند) در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS₂₀ و مقایسه میانگین ها با روش دانکن صورت گرفت.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر رقم و نوع خشک کن بر فاکتورهای تبدیل و کیفی
Table 1- Analize of variance effect of variety and dryer on milling factor

Sig.	Treatment	Parameter
0.000**	Variety	Milling recovery
0.832 ^{ns}	Dryer	راندمان تبدیل
0.807 ^{ns}	dryer×variety	
0.000**	Variety	Head rice yield
0.034 ^{ns}	Dryer	راندمان برنج سالم
0.418 ^{ns}	dryer×variety	
0.711 ^{ns}	Variety	Track percentage
0.671 ^{ns}	Dryer	درصد ترک
0.433 ^{ns}	dryer×variety	
0.000**	Variety	Whitness
0.204 ^{ns}	Dryer	درجه سفیدی
0.005*	dryer×variety	

*significant at the 0.05 level, ** significant at the 0.01 level, ^{ns} not significant

جدول ۲- مقایسه میانگین فاکتورهای تبدیل و کیفی

Table 2- Mean comparison of milling factor

Whitness	Track %	%Head rice yield	%Milling recovery	Treatment
				Variety
56.7 ^a	14.7 ^a	57.8 ^c	62.2 ^c	Shiroodi
54.2 ^b	15.7 ^a	62.5 ^c	66.7 ^b	Tarom
48.7 ^c	14 ^a	74.2 ^b	69 ^a	Gohar
48.3 ^c	14 ^a	87.7 ^a	69.2 ^a	Hashemi
				Dryer
51.7 ^a	14.8 ^a	67.9 ^b	66.8 ^a	Traditional
52.3 ^a	14.3 ^a	73.2 ^a	66.7 ^a	Intelligence

Same letters have not significant difference at the column

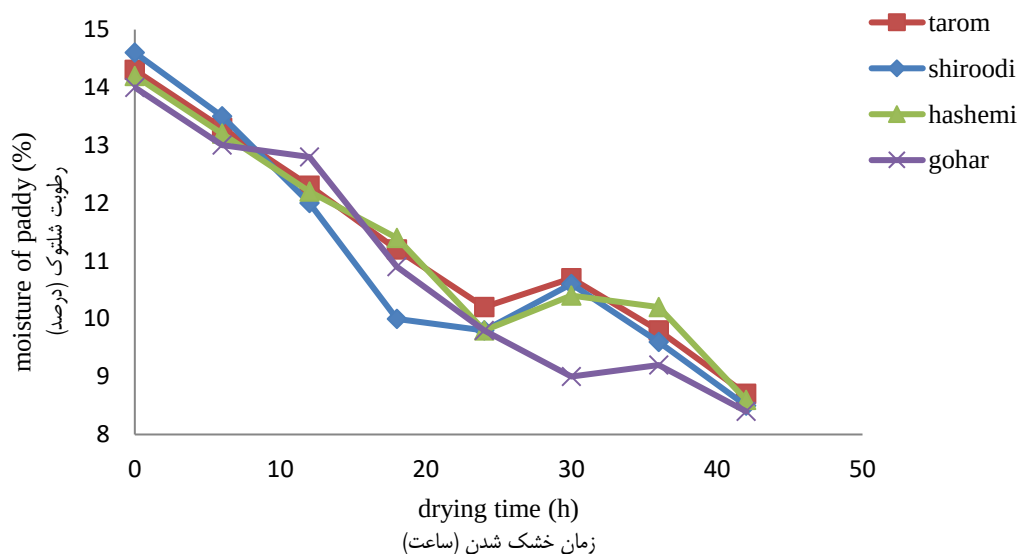
جدول ۳- مقایسه میانگین سفیدی ارقام در دو نوع خشک کن

Table 3- Mean comparison of whitness in two dryer

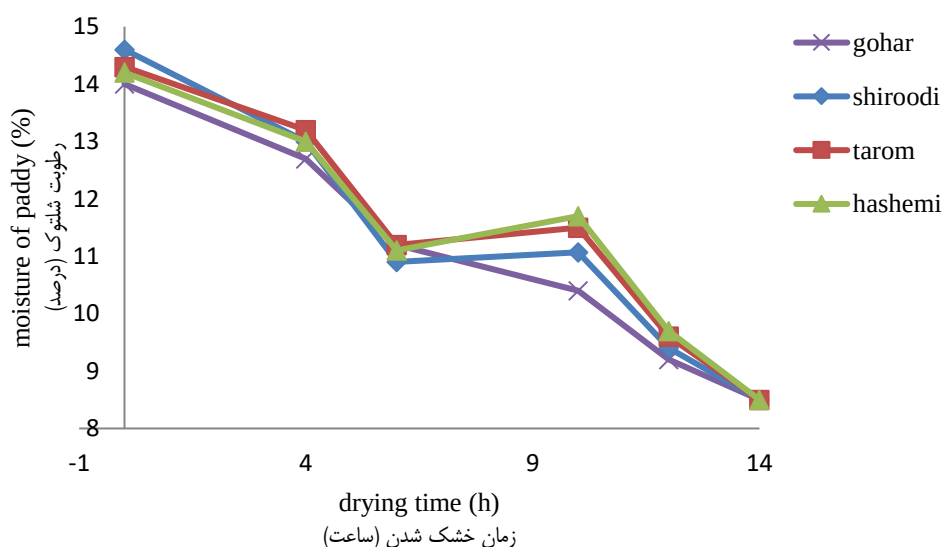
Mean of varieties	Gohar	Shiroodi	Tarom	Hashemi	Dryer
51.7 ^a	49.2 ^a	56.6 ^a	54.5 ^a	46.1 ^b	Traditional
52.3 ^a	48.2 ^a	57 ^a	53.9 ^a	50.6 ^a	Intelligence

نسبت به خشک‌کن سنتی ۵٪ کاهش و در تحقیق Gazor و Alizadeh (۲۰۲۰) نیز درصد شکستگی در خشک‌کن دوار نسبت به خشک‌کن سنتی ۷٪ کاهش یافته بود. افزایش نسبت برنج سالم در خشک‌کن‌های جریان گردشی، دوار و بستر خوابیده مجهز به همزن را می‌توان به کاهش تنش‌های حرارتی وارد بر دانه در اثر یکنواختی در فرآیند خشک‌کردن نسبت داد (Moumeni and Gazor, 2019; Alizadeh and Gazor, 2020).

اثر نوع رقم و خشک‌کن بر راندمان برنج سالم معنادار بود (جدول ۱). بیشترین راندمان برنج سالم به رقم طارم هاشمی و کمترین به رقم شیروودی تعلق داشت (جدول ۲). خشک‌کن هوشمند نیز ۵٪ راندمان برنج سالم بالاتری نسبت به خشک‌کن رایج داشت. به اثر نوع رقم و نوع خشک‌کن بر راندمان برنج سالم و درصد شکستگی اشاره شده است (Fan et al., 2000; Kent, 1982). در تحقیقات Gazor و Moumeni (۲۰۱۹) درصد شکستگی در خشک‌کن جریان‌گردشی



شکل ۲- رابطه بین مدت زمان خشکاندن و درصد رطوبت شلتوک در خشک‌کن رایج
Fig. 2. Change of moisture content of paddy with drying time in traditional dryer



شکل ۳- رابطه بین مدت زمان خشکاندن و درصد رطوبت شلتوک در خشک‌کن هوشمند
Fig. 3. Change of moisture content of paddy with drying time in intelligence dryer

شیرودی، طارم، هاشمی و گوهر به ترتیب از ۱۴/۶، ۱۴/۲، ۱۴/۳ و ۱۴/۰ درصد به ۸/۵ درصد در هر دو خشک کن کاهش یافته است که مدت زمان آن در خشک کن رایج ۴۳/۱ ساعت و در خشک کن هوشمند ۱۴/۲ ساعت بوده است. یعنی زمان خشک کردن در خشک کن هوشمند به یک سوم کاهش یافت و میانگین نرخ خشک کردن برای چهار رقم در خشک کن رایج ۰/۱۳۵ و در خشک کن هوشمند ۰/۴۱۲ درصد بر ساعت بوده است. در خشک کن هوشمند، هوای گرم از دو مسیر یکی از زیر شبکه مشبک و دیگری از طریق محور دمنده ها که به صورت مشبک می باشد، به داخل توده شلتوک جریان می یابد. این امر از یک سو و جابجایی و بهم زدن شلتوک ها توسط همزن ها از سوی دیگر باعث جذب سریعتر رطوبت توسط هوای گرم شده و از این طریق خشک شدن شلتوک تا سطح رطوبت نهایی در زمان کمتری انجام شد. به کاهش زمان خشک شدن شلتوک در خشک کن های ساخته شده در مقایسه با نوع متداول به دلیل بهم خوردن محصول و افزایش سرعت خشک شدن آن اشاره شده است (Gharnasi Gharavi et al., 2017; Tahmasbi et al., 2008).

نتیجه گیری

طراحی و ساخت این نوع خشک کن با همزن علاوه بر کاهش زمان خشک کردن به یک سوم زمان مورد نیاز در سیستم های رایج و به تبع آن کاهش مصرف انرژی، سبب افزایش راندمان برنج سالم تا ۵٪ و گاهی هم افزایش سفیدی رقم شده بود. این خشک کن می تواند جایگزین مناسبی برای کارخانه های قدیمی باشد که فضای مناسبی برای نصب خشک کن جریان گردشی و یا رقتی برای تغییرات اساسی در خط تولید ندارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پروژه تحقیقاتی با شماره ۰۰۴۰۴۹۳۱۰۶ بوده است و با مشارکت موسسه تحقیقات برنج کشور- معاونت مازندران انجام شده است.

هیچ کدام از نوع رقم و نوع خشک کن تاثیر معنی داری بر درصد ترک دانه نداشتند. با وجود بالاتر بودن برنج سالم در خشک کن هوشمند، میزان ترک با دو خشک کن تفاوت معناداری نداشت. الزاما بین میزان ترک و برنج سالم ارتباط مستقیمی وجود ندارد (Aquerreta et al., 2007; Latifi, 2011).

درجه سفیدی ارقام مختلف تفاوت معنی داری داشت (جدول ۱). بیشترین سفیدی مربوط به رقم شیرودی و کمترین مربوط به رقم طارم هاشمی بود (جدول ۲). نوع خشک کن تاثیر معناداری بر سفیدی رنگ ارقام نداشت. اثر متقابل رقم و نوع خشک کن بر سفیدی رنگ معنادار شد زیرا فقط در رقم طارم هاشمی سفیدی در خشک کن رایج به طور معنی داری کمتر از خشک کن هوشمند شده بود در صورتی که در سه رقم دیگر سفیدی رنگ دانه در دو نوع خشک کن تقریبا مانند هم بود (جدول ۳). البته به دلیل زمان بیش تر خشک شدن در خشک کن های رایج و احتمال رخ دادن واکنش های مایلارد که ترکیب پروتئین و قندهای موجود در دانه در اثر حرارت می باشد (Lamberts et al., 2006)، انتظار تغییر رنگ و کاهش سفیدی در خشک کن رایج می رود اما در کل اثر خشک کن بر سفیدی معنادار نبود (جدول ۱). Mehdi zadeh و Zomorrodian (۲۰۰۸) نیز به افزایش سفیدی رنگ برنجی که با خشک کن خورشیدی در مدت زمان کمتری نسبت به روش خشک کردن طبیعی در آفتاب بدست آمده بود اشاره داشتند (Mehdi zadeh and Zomorrodian, 2008). اما در مطالعه Gazor و Moumeni (۲۰۱۹) سفیدی رنگ رقم یک نوع طارم در خشک کن رایج حتی مقداری بیشتر از خشک کن جریان گردشی شده بود با وجود آنکه زمان خشک کردن در خشک کن جریان گردشی به نصف کاهش یافته بود (Moumeni and Gazor, 2019).

مدت زمان خشک کردن شلتوک

نمودار رابطه بین مدت زمان خشک کردن و رطوبت شلتوک (بر پایه وزن تر) در دو نوع خشک کن رایج و هوشمند در ارقام مورد آزمایش به ترتیب در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. رطوبت شلتوک در ارقام

منابع

1. Alizadeh, M.R. and Habibi, F. (2016). A comparative study on the quality of the main and ratoon rice crops. *Food Quality*, 39, 669-674. <https://doi.org/10.1111/jfq.12250>
2. Aquerreta, J., Iguaz, A., Arroqui, C., and Virseda, P. (2007). Effect of high temperature intermittent drying and tempering on rough rice quality. *Food Engineering*, 80, 611-618. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.012>
3. Battacharya, K. R. (1980). Breakage of rice during milling. *A Review Trop. Sci.* 22, 225.
4. Brooker, D. B., F. W. Baker Arkema, and C. W. Hall. (1992). Drying and storage of grains and oilseeds. New York, U.S.A. AVI Book publisher.
5. Fan, J., Siebenmorgen, T.J. and Yang, W. (2000). A study of head rice yield reduction of long and medium grain rice varieties in relation to various harvest and drying conditions. *Transactions of the ASABE*, 43 (6), 1709-1714.

6. Gazor, H. R. And Alizadeh, M.R. (2020). Comparison Influence of Rotary Dryer on Paddy (Hashemi Var.) Drying and Rice Milling Quality. *Agricultural Mechanization and Systems Research*, 21(74), 17-32. (In Persian).
7. Gazor, H. R. And Moumeni, A. (2019). Comparison of the Paddy Drying Process and Milling Quality between Re-circulating and Conventional Batch Type Dryers. *Journal of Agricultural Machinery*, 9(2), 365-374. (In Persian).
8. Gharnasi Gharavi, O., Shamsabadi, H. A., Afkarisayyah, A. H., Askari, A. and Rasekh, M. (2017). Optimization of paddy rice drying using response surface methodology. *EJFPP*, 10(1), 99-116. (In Persian).
9. Hall, C. W. (1970). Handling and storage of food grains in tropical and subtropical areas. FAO Agriculture Development paper No. 90.
10. Iguaz, A., Rodrigues, M. and Viseda, P. (2006). Influence of handling and processing of rough rice on fissures and head rice yields. *Food Engineering*, 77, 803-809. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.006>
11. Kent, N.L. (1982). Technology of cereals an introduction for students of food science and agriculture. Third edition. London, UK: Pergamum Press.
12. Kocsis L., I. Keppler, M. Herdovics, L. Fenyvesi, and I. Farkas. (2011). Investigation of moisture content fluctuation in mixed flow dryer. *Agronomy Research Biosystem Engineering*, Special Issue, 1, 99-105.
13. Lamberts, L., Brijis, K., Mohamed, R., Verhelst, N. and Delcour, J. A. (2006). Impact of browning reactions and bran pigments on color of parboiled rice. *Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9924-9929. <https://doi.org/10.1021/jf062140j>
14. Latifi, A. (2011). Effect of drying temperature and paddy final moisture on milling quality of three rice varieties. *Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 102, 71-75. (In Persian).
15. Mehdizadeh, Z. And Zomorrodian, A. (2008). Study effect of solar drying method on rice quality. *International Journal of Agricultural Science and Technology*, 11(5). (In Persian).
16. Mondoza, E.E. and Rigor, A. C. (1983). Quality deterioration in on- farm level of operation. Napier project. *Research Report of Food Terminal Inc.*
17. Pan, Z., Khir, R., Godfrey, L.D., Lewis, R., Thompson, J. F., and Salim, A. (2008). Feasibility of simultaneous rough rice drying and disinfections by infrared radiation heating and rice milling quality. *Food Engineering*, 84, 469-479.
18. Sabori, S. (2001). Proper height in fix bed dryer of paddy. Rice research report. (In Persian).
19. Siebenmorgen, T. J., Qin, G., and Jia, C. (2005). Influence of drying on rice fissures formation rates and mechanical strength distributions. *Transactions of the ASABE*, 48, 1835-1841.
20. Soponronnarit, S., Chiawwet, M., Prachayawarakorn, S., Tungtrakul, P. and Taechapairoj, C. (2008). Comparative study of physicochemical properties of accelerated and naturally aged rice. *Food Engineering*, 85, 268- 276. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.023>
21. Tahmasbi, H. A., Mousavi, S. H., Hamedghafarian, M. R. and Davoodi, M. (2008). Drying rice paddy with continuous vibrating tray and comparing it with semi-continuous column dryer, 12th National Congress of Chemical Engineering. (In Persian).
22. Tajadoditalab, K. (2010). Effect of drying temperature and final moisture of paddy on rice quality and cooking with abrasive whitener. *Rice research report*. (In Persian).
23. Zhang, Q., Yang, W., Sun, Z. and Siebenmorgen, T. J. (2002). A study of rice kernel fracture by three point bending tests. Dept of food science report, Univ. of Arkansas.
24. Zheng, X. and Lan, Y. (2007). Effects of Drying Temperature and Moisture Content on Rice Taste Quality. *The Proceedings of the 5th Asia-Pacific Drying Conference*, 13– 15 August, Hong Kong. https://doi.org/10.1142/9789812771957_0162



Encapsulation of aqueous extract of *Arctium lappa* L. root and study its effect on physicochemical and functional properties of Synbiotic orange-carrot juice

Farzaneh Esmaeili¹, Mahnaz Hashemiravan^{1*}, Mohammad Reza Eshaghi¹, Hassan Gandomi²

Received: 2021.10.24

Revised: 2021.11.29

Accepted: 2021.12.08

Available Online: 2021.12.08

How to cite this article:

Esmaeili, F., Hashemiravan, M., Eshaghi, M. R., Gandomi, H. (2022). Encapsulation of aqueous extract of *Arctium lappa* L. root and study its effect on physicochemical and functional properties of Synbiotic orange-carrot juice. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5). 657-679.

Abstract

Introduction: Nowadays, there is a great tendency to consume functional foods, with special medicinal and extranutritional value in addition to basic nutritional properties. Foods containing probiotics and prebiotic compounds are classified in this category. Inulin is a water soluble storage polysaccharide and belongs to a group of non-digestible carbohydrates called fructans. Inulin is naturally present in some flowering plant species such as chicory and burdock root. The amount of inulin in these plants is in the range of 1 to 20% of the weight of the fresh plant. Pharmacological studies report that Burdock root contains significant amounts of the inulin as a prebiotic compounds, also exhibits a wide range of biological activities, specifically antioxidative, anti-inflammatory, and free radical scavenging activities. The aim of this study was to encapsulate the aqueous extract of burdock root and use it in a probiotic drink based on orange-carrot juice.

Material and Method: The Burdock roots were obtained from the local medical plant market, Tehran, Iran. Orange and carrot juice were purchased from Nooshin and Tandis (Food Company, Tehran, Iran) respectively. Maltodextrin and gum Arabic were prepared from Merck, Germany. First, the plant roots were dried to 5.2% moisture and then its aqueous extract was extracted with the help of ultrasonication. Then burdock roots extracts were encapsulated by spray drying (microencapsulation) and freeze drying (nanocapsulation) using maltodextrin and gum Arabic as wall coating agents. Capsule properties including encapsulation efficiency, particle size distribution, moisture, density, structural properties, TPC and antioxidant were determined. Then the encapsulated extracts (at levels of 0.5 and 1%) and free extract were used in the formulation of probiotic orange-carrot juice and its effect on the survival of probiotic bacteria as well as physicochemical and sensory properties of the final product during 30 days in refrigerator ($4 \pm 0.5^\circ\text{C}$) were investigated. All experiments were carried out based on complete randomized design and the results represent the mean of at least three replicates. The data obtained were analyzed by the analysis of variance (ANOVA) using Minitab 16.0 statistical software. Significant differences between means were determined by Duncan's multiple range test at a probability levels of $P \leq 0.05$.

Results and Discussion: The results of encapsulation phase showed that Nanocapsules had higher efficiency and phenolic compounds content than microcapsules. The highest level of efficiency (92.75%) and phenolic compounds (0.385 mg GAE/g) and the smallest capsule particle size ($14.33 \pm 0.22 \mu\text{m}$) were observed in Nanocapsules prepared with gum Arabic. The SEM images showed that the produced capsules in terms of microstructure, had flaky/glassy and angular surfaces and did not have a regular shape. By adding different forms of the extract (free/micro/Nano) to the orange-carrot juice, it was found that its characteristics including viability of probiotics, formalin index, turbidity, viscosity and antioxidant activity were significantly enhanced during cold storage compared to the control ($p < 0.05$). During

1. Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

(*Corresponding Author Email: m_hashemiravan@yahoo.com)

DOI: [10.22067/ifstrj.2021.73234.1107](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.73234.1107)

refrigeration, turbidity, acidity and IC50 increased in all treatments, especially in the control sample, while other characteristics (including the viability of probiotic bacteria), showed a decreasing trend. Addition of different forms of burdock root extract did not have an adverse effect on the flavor and odor of the samples, so that, all treatments were acceptable. Therefore, based on the results of this study, it can be stated that encapsulated burdock root extracts, especially in the form of nanocapsulation, can be used to increase the viability of probiotics and enhancement the antioxidant activity of functional foods.

Key words: Functional food, Encapsulation, Burdock root extract, Synbiotic, Formalin index.

مقاله علمی-پژوهشی

انکپسولاسیون عصاره آبی ریشه گیاه بابا آدم (*Arctium lappa*) و اثر آن بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملگرایی نوشیدنی سین بیوتیک بر پایه آب پرتقال- هویج

فرزانه اسمعیلی^۱ - مهناز هاشمی روان^{۲*} - محمد رضا اسحاقی^۳ - حسن گندمی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۷

چکیده

هدف از این تحقیق ریزپوشانی عصاره آبی ریشه گیاه بابا آدم و استفاده از آن در نوشیدنی پروبیوتیک بر پایه آب پرتقال- هویج بود. برای این منظور ابتدا عصاره ریشه بابا آدم با دو روش میکروکپسولاسیون و نانوکپسولاسیون و با استفاده از دو ترکیب مالتودکسترین و صمغ عربی به عنوان پوشش دیواره، ریزپوشانی گردید. سپس عصاره ریزپوشانی شده (در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد) به همراه عصاره آزاد در فرمولاسیون نوشیدنی پروبیوتیک آب پرتقال- هویج استفاده و اثر آن بر زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک و همچنین ویژگی های فیزیکوشیمیایی و حسی محصول نهایی طی دوره نگهداری ۳۰ روزه در دمای یخچال ($4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مرحله ریزپوشانی نشان داد که نانوکپسول ها دارای راندمان و محتوای فنلی بالاتری نسبت به میکروکپسول ها بودند ($p < 0.05$)، بطوریکه بالاترین راندمان ($92/75\%$) و سطح ترکیبات فنلی (385 mgGAE/g) و کوچک ترین اندازه ذرات کپسول ($14/33 \pm 0/22$ میکرومتر) در نانوکپسول های تهیه شده با صمغ عربی مشاهده شد. تصاویر SEM نیز حاکی از این بود کپسول های تولیدی از لحاظ ریزساختار، دارای سطوح شیشه ای و زاویه دار بوده و شکل منظمی ندارند. با افزودن فرم های مختلف عصاره ریشه بابا آدم به فرمولاسیون نوشیدنی پروبیوتیک آب پرتقال- هویج حاوی 10^8 CFU/ml باکتری *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس*، مشاهد شد که پارامترهای کیفی از جمله عدد فرمالین، کدورت، ویسکوزیته، فعالیت آنتی اکسیدانی و بقاء باکتری های پروبیوتیک در نوشیدنی ها نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$). طی دوره نگهداری در یخچال میزان کدورت، اسیدیته و IG50 در همه تیمارها به ویژه در نمونه کنترل افزایش یافت در حالی که سایر شاخص ها از جمله قابلیت زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک روند کاهشی نشان داد. افزودن فرم های مختلف عصاره ریشه بابا آدم، تأثیر نامطلوبی بر طعم و بوی نمونه ها نداشت به طوری که کلیه تیمارها قابل پذیرش بودند. بنابراین، بر اساس نتایج این مطالعه می توان بیان کرد که عصاره ریشه بابا آدم، به ویژه در قالب نانوکپسول، می تواند برای افزایش ماندگاری پروبیوتیک ها و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی غذاهای عملگرا طی فرایند تولید و نگهداری مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: غذای عملگرا، عصاره بابا آدم، سین بیوتیک، ریزپوشانی، عدد فرمالین.

مقدمه

رژیم غذایی روزانه است (Haghsheenas et al., 2015). غذاهای عملگرا آن دسته از مواد غذایی یا اجزاء رژیم غذایی بوده که علاوه بر مواد مغذی نظیر کربوهیدرات، پروتئین، چربی، ویتامین و مواد معدنی اثرات سودمندی نیز بر سلامتی انسان داشته و سبب ارتقاء سلامت و بهبود کیفیت و کمیت زندگی می گردد. از جمله این موارد می توان به مواد زیست فعال طبیعی مانند پروبیوتیک ها، آنتی اکسیدان ها، فیبرهای خوراکی و همچنین اجزای غذایی که به طور مصنوعی به مواد غذایی

در دنیای صنعتی، مصرف کنندگان به طور روزافزون به نقش فعال مواد غذایی در سلامت انسان، افزایش طول عمر، پیشگیری از سرطان و جلوگیری از بروز بیماری های گوارشی علاقمند شده اند. در سال های اخیر توجه خاصی به تولید غذاهای عملگرا شده است. هدف اصلی از غذاهای عملگرا معرفی میکروارگانیسم ها و یا ترکیبات مفید از طریق

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد ورامین پیشوا، ورامین، ایران.

۴- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد ورامین پیشوا، ورامین، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد ورامین پیشوا، ورامین، ایران.

* نویسنده مسئول: Email: m_hashemiravan@yahoo.com

DOI: 10.22067/iftstrj.2021.73234.1107

اضافه شده، مانند پری بیوتیک‌ها اشاره نمود (Wegerif & Hebinck, 2016).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف منظم و کافی آنها با بهبود خواص میکروبی روده، اثرات سودمندی بر سلامت مصرف کننده می‌گذارد. برای تحقق این آثار سلامتی بخش مصرف منظم 10^7 سلول زنده توصیه می‌گردد (Lebeka et al., 2018). پری بیوتیک‌ها ترکیبات الیگوساکاریدی غیرقابل هضمی هستند که اثرات فیزیولوژیکی مفید خود را بر میزبان از طریق تحریک رشد انتخابی پروبیوتیک‌ها اعمال می‌کنند (Shoaib et al., 2016). یک ماده غذایی حاوی پروبیوتیک و پری بیوتیک را سین بیوتیک یا غذای فراویژه می‌نامند. بین پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها در فراورده‌های سین بیوتیک اثر سینرژیستی وجود دارد (Wegerif & Hebinck, 2016). اینولین و الیگوفروکتوزها جزء ترکیبات پری بیوتیکی هستند که با هدف بهبود ویژگی‌های تکنولوژیکی و با فواید تغذیه‌ای در محصولات غذایی به کار می‌روند (Tewari et al., 2015). اینولین به طور طبیعی در برخی از گونه‌های گیاهی گلدار مانند کاسنی و ریشه گیاه بابا آدم وجود دارد و همچنین توسط برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها نیز تولید می‌شود. مقدار اینولین در این گیاهان در محدوده ۱ تا ۲۰ درصد وزن گیاه تازه است (Shoaib et al., 2016).

گیاه بابا آدم با نام علمی *Arctium lappa* از تیره کاسنی (مرکبیان) و خانواده *Asteraceae* است و گیاهی علفی، دو ساله و دارای ساقه ضخیم منشعب می‌باشد، که به حالت وحشی و خودرو در دشت‌ها و نواحی مرطوب و سایه دار در نواحی معتدل اروپا و آسیا می‌روید (Wu et al., 2020). این گیاه دارای ریشه‌ای دراز به قطر انگشت، با ظاهر دوکی شکل و شیارهای طولی عمیق به رنگ قهوه‌ای است که در مقطع سفیدرنگ می‌باشد. در ایران محل رویش گیاه بابا آدم در استان‌های گیلان، گرگان، مازندران، تبریز، همدان، اراک، قزوین و کرج است. برداشت محصول در اواخر اسفند تا اردیبهشت ماه سال دوم رشد گیاه صورت می‌گیرد. در این مدت، ریشه به حداکثر رشد خود رسیده و به اندازه کافی گوشت‌دار می‌شود (Samsam Shariat, 2005).

ترکیبات شیمیایی ریشه بابا آدم شامل اینولین، روغن فرار، تانن، رزین، قند، آهن، کلسیم، کوئرستین^۱، آرکتیژنین^۲ و ویتامین C می‌باشد. ریشه بابا آدم همچنین حاوی ترکیبات مغذی رایج نظیر اسیدهای آمینه ضروری، عناصر فلزی مانند پتاسیم، کلسیم، فسفر، منیزیم، منگنز، سدیم، روی و مس، ویتامین‌های B₁، B₂، C و A، فیبر خام، فسفر و کاروتن می‌باشد. از ریشه بابا آدم در طب سنتی جهت درمان ورم لوزه،

گل‌درد، خارش بدن، مشکلات پوستی مختلف، مدر، عرق آور و پاک کننده خون استفاده می‌شود. مطالعات دارویی نشان می‌دهد که ریشه گیاه بابا آدم طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی شامل خاصیت آنتی اکسیدان، ضد التهابی و فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد را دارد (Wu et al., 2020). همچنین گزارش شده است که عصاره لیوفیلیزه برگ بابا آدم فعالیت ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های دهان را دارد و در برابر باکتری‌های مرتبط با عوامل بیماری‌زای عصب دندان مانند *Sodomonas Atroginosa*^۳، *Bacillus subtilis*^۴ و *Candida albicans*^۵ موثر می‌باشد (Petkova et al., 2020). فعالیت بیولوژیکی عصاره‌ها مانند فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می‌تواند تحت تأثیر شرایط محیطی تغییر یابد، به طوری که گزارش ناپایداری این ترکیبات در شرایط محیطی ثبت شده است. سرعت و میزان تجزیه ترکیبات عصاره‌ها بستگی به ساختار شیمیایی ریز مغذی‌ها، خواص ماتریس مواد غذایی، شرایط فرآیند و محیط نگهداری دارد (Rakmai et al., 2018). یکی از روش‌های افزایش پایداری ترکیبات حساس، انکپسولاسیون (ریزپوشانی) است که بر اساس اندازه ذرات به دو نوع میکروکپسولاسیون و نانوکپسولاسیون تقسیم می‌شوند (Gilles et al., 2012).

ریزپوشانی، روش بسته‌بندی اجزاء و ترکیبات حساس در داخل یک پوشش یا دیواره است، تا از تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی محیطی مصون بمانند. با استفاده از این روش، ضمن جلوگیری از هدر رفتن ترکیبات فرار و حساس به شرایط محیطی، می‌توان آن‌ها را تحت شرایط کنترل شده‌ای رها نمود. از این رو، ترکیبات فعال، حساس یا فرار نظیر ویتامین‌ها، ترکیبات عطر و طعم‌زا، عصاره‌های گیاهی، اسانس‌ها و غیره می‌توانند با استفاده از روش ریزپوشانی، به شکل پایداری تبدیل شوند (Loksuwan, 2007). دو روش متداول و مهم برای ریزپوشانی کردن ترکیبات فعال، خشک کردن پاششی و خشک کردن انجمادی است. ترکیبات مختلفی را می‌توان به عنوان پوشش یا دیواره در فرایند ریزپوشانی استفاده کرد. پلی ساکاریدهایی مانند مالتودکسترین، نشاسته، صمغ عربی و اینولین به دلیل تنوع، هزینه پایین و کاربردهای فراوان در صنایع غذایی، بیش از سایر گونه‌ها در پوشش ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار می‌گیرند (Fernandes et al., 2014).

آب میوه‌ها دارای مواد مغذی مفیدی نظیر مواد معدنی، ویتامین‌ها و آنتی اکسیدان‌ها هستند و می‌توانند ماده‌ای مناسب برای کشت باکتری‌های پروبیوتیک باشند. این مواد از پتانسیل بالا برای تبدیل شدن به محصول پروبیوتیک برخوردارند، زیرا خود فرآورده‌ای

سپس هر کدام از محلول های حاصله، در دمای ۶۰- ۴۰ درجه سلسیوس بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه همزده شدند تا محلول دارای حجم نهایی ۲۰۰ میلی لیتر و محتوای مواد جامد کل بین ۲۱-۱۸ درجه بریکس به دست آمد. پس از همزدن محلول ها، ۲ گرم عصاره بابا آدم به محلول های تولیدی اضافه شده و مخلوط گردید. مخلوط حاصله توسط هموژنیزاتور به مدت ۵ دقیقه در ۹۵۰۰ rpm- ۸۰۰۰ هموژن شد، تا پراکندگی مواد به طور کامل صورت گیرد (Le et al., 2017). سپس مخلوط حاصله توسط دستگاه خشک کن پاششی به پودر تبدیل گردید، بدین صورت که محلول تولیدی توسط یک پمپ با سرعت دوران قابل کنترل بین ۱ تا ۱۰۰ درصد به خشک کن پاششی تزریق شد. شرایط بهینه ریزپوشانی دستگاه بدین صورت بود؛ دمای ورودی ۱۲۰ درجه سانتی گراد، سرعت تغذیه ۶/۶ میلی لیتر در دقیقه، قطر نازل ۸-۵ میلی متر، جریان هوای خشک ۴۵-۴۲ لیتر بر ساعت، اسپراتور ۹۰ درصد و سرعت پمپ ۲۰ درصد (معادل ۵ میلی لیتر بر دقیقه). پودر تولیدی در زیر سیکلون در انتهای مسیر جمع آوری شده و بلافاصله برای سرد شدن به دسیکاتور منتقل شد. سپس در ظروف مخصوص در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و دور از نور و رطوبت برای انجام سایر آزمایشات نگهداری گردید (Cheraghali et al., 2016).

نانوکپسولاسیون عصاره

۴۰ گرم مالتودکستین و صمغ عربی در آب مقطر حل شده و قبل از تهیه سوسپانسیون، به مدت یک شبانه روز در یک حمام آب لرزشی نگهداشته شدند. سپس ۲ گرم عصاره به محلول های آماده سازی شده، اضافه شد. همزدن مخلوط های حاصله توسط همزن مغناطیسی انجام گرفت، تا به طور هموژن و یکنواخت درآمد. در یک ظرف شیشه ای دیگر، ۱ گرم سدیم تری پلی فسفات (STPP) در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شده و ۱ سی سی توئین ۸۰ (۱ v/v در صد) به محلول STPP اضافه شده و همزده شد. سپس محلول صمغ عربی / مالتودکستین- عصاره ریشه بابا آدم به محلول STPP اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد، سپس در سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن، رسوب تشکیل شده توسط خشک کن انجمادی خشک گردید (Zahrani et al., 2016).

تهیه نوشیدنی سین بیوتیک آب پرتقال- هویج

به منظور تهیه نمونه نوشیدنی پرتقال- هویج پروبیوتیک، ابتدا ترکیب ۵۰ میلی لیتر آب پرتقال و ۵۰ میلی لیتر آب هویج، شکر (۸/۵ درصد وزنی / حجمی)، اسید سیتریک (۰/۱ درصد وزنی / وزنی) مخلوط

سلامت بخش بوده و توسط گستره ی وسیعی از مردم مصرف می شوند. همچنین آب میوه ها از نظر حسی مقبول عام بوده و برخلاف فرآورده های لبنی، فاقد ترکیبات ناسازگار با بدن نظیر لاکتوز هستند (White & Hekmat, 2018).

بر این اساس، با توجه به حضور اینولین در ریشه بابا آدم و نقش اینولین در تحریک رشد باکتری های پروبیوتیک، در این تحقیق، ابتدا عصاره ریشه بابا آدم توسط روش های خشک کردن پاششی و خشک کردن انجمادی با استفاده از ترکیبات مالتودکستین و صمغ عربی ریزپوشانی گردید، سپس اثر عصاره بابا آدم به صورت آزاد و ریزپوشانی شده بر خصوصیات کیفی، حسی و بقاء باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس* در آب میوه سین بیوتیک حاصل از ترکیب آب پرتقال- هویج طی دوره نگهداری ۳۰ روزه در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

استخراج عصاره ریشه گیاه بابا آدم

برای این منظور ریشه های گیاه بابا آدم را پوست کنده، برش داده و در دمای ۶۰- ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. سپس، ریشه های خشک شده را آسیاب نموده و از الک ۵۰ میکرومتر عبور داده شد تا به اندازه یکنواخت برسند. نمونه آماده شده با رطوبت تقریباً ۵/۲ درصد در ظروف خشک شده برای استفاده بعدی ذخیره شد. فرایند استخراج عصاره از ریشه گیاه بابا آدم با استفاده از حمام فراصوت (Bandelin Sonorex digitec، آلمان) انجام شد. آزمایش های استخراج با کمک امواج فراصوت در نسبت ماده جامد به مایع (۳۵:۱ گرم در میلی لیتر)، دمای فراصوت (۵۵ درجه سانتی گراد) و زمان فراصوت (۳۵ دقیقه) با توجه به نقطه بهینه به دست آمده در مرحله اول انجام شد (Esmaeili et al., 2021; Milani et al., 2011). پودر ریشه بابا آدم و آب در نسبت ۱:۱۰ در یک ارلن مایر مخلوط و سپس در حمام آب قرار داده شد. پس از اتمام فرایند اولتراسوند، مخلوط حاصل با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 2-16K, Germany) شدند و مایع رویی با فیلتر کاغذی فیلتر شد تا بقایای نامحلول حذف گردد (Yang et al., 2017).

میکروکپسولاسیون عصاره

جهت تهیه میکروکپسول های عصاره ریشه گیاه بابا آدم، در ابتدا ۴۰ گرم از مواد پوشش دهنده (۲۰ درصد وزنی / حجمی)، شامل مالتودکستین و صمغ عربی به طور جداگانه در آب مقطر حل گردیدند.

شد. برای ایجاد یکنواختی و کاهش میزان دو فاز شدن نوشیدنی، از صمغ پکتین (۰/۱ درصد) استفاده گردید (4 ± 0.3 - pH=۳/۹۶). در سایر تیمارها، فرم آزاد، میکروکپسوله شده و نانوکپسوله شده عصاره ریشه بابا آدم، هر کدام در دو سطح ۰/۵ g/100mL و ۱، جایگزین بخشی از آب فرمولاسیون شد. پاستوریزاسیون نمونه‌ها در بن‌ماری در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت (Raiesi et al., 2013). پس از سرد شدن آب‌میوه‌ها، به هر کدام از تیمارها به میزان ۱ درصد حجمی/ حجمی از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس با کد سویه IBRC-M 11321 (CFU/ml) $10^8 \times 1/5$ افزوده شد. به‌منظور تهیه استوک باکتری پروبیوتیک با روش نیم مک فارلند، ابتدا محتوی آمپول‌های لیوفلیزه خریداری شده از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران به محیط MRS broth اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردید، سپس بر روی

محیط کشت MRS agar انتقال و به‌صورت خطی کشت گردید، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون از کلونی‌های رشد یافته برای تهیه محلول نیم مک فارلند استفاده گردید. مقداری از کلونی باکتری به‌وسیله لوپ برداشته و در لوله‌های حاوی محلول رینگر حل شد و سپس جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت گردید، زمانیکه جذب نمونه در محدوده ۰/۵ قرار گیرد محلول نیم مک فارلند تهیه شده که تعداد باکتری موجود در آن برابر $10^8 \times 1/5$ می‌باشد.

نمونه‌های آب‌میوه پس از بسته‌بندی در بطری‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و بعد از پایان انکوباسیون، به مدت یک ماه در دمای یخچال نگهداری شدند و در روزهای ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ انبارمانی، آزمون‌های مربوطه بر روی آن‌ها انجام گرفت. تیمارهای مورد مطالعه در این مرحله، در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- تیمارهای نوشیدنی مورد بررسی در این تحقیق
Table 1- Beverage treatments studied in this research

کد تیمارها	توضیحات
Ctrl	شاهد (نوشیدنی پروبیوتیک فاقد فرم های مختلف عصاره ریشه بابا آدم)
T1	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 0/025 g/100mL فرم آزاد عصاره ریشه بابا آدم
T2	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 0/05 g/100mL فرم آزاد عصاره ریشه بابا آدم
T3	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 0/5 g/100mL عصاره میکروکپسوله شده با مالتودکسترین
T4	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 1 g/100mL عصاره میکروکپسوله شده با مالتودکسترین
T5	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 0/5 g/100mL عصاره میکروکپسوله شده با صمغ عربی
T6	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 1 g/100mL عصاره میکروکپسوله شده با صمغ عربی
T7	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 0/5 g/100mL عصاره نانوکپسوله شده با مالتودکسترین
T8	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 1 g/100mL عصاره نانوکپسوله شده با مالتودکسترین
T9	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 0/5 g/100mL عصاره نانوکپسوله شده با صمغ عربی
T10	نوشیدنی پروبیوتیک حاوی 1 g/100mL عصاره نانوکپسوله شده با صمغ عربی

محافظ که در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت جریان ۰/۱ میلی‌لیتر در دقیقه کار می‌کرد، انجام شد (Petkova et al., 2020).

راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی، از طریق توزین جرم مواد جامد قبل از ریزپوشانی و جرم کپسول‌های به‌دست آمده بعد از ریزپوشانی و از طریق رابطه ۱ به‌دست آمد (Badfarsa et al., 2017).

(۱) $100 \times$ ریزپوشانی از قبل جامد مواد کل جرم/ریزپوشانی از بعد حاصله‌های کپسول کل جرم = راندمان تولید ریزکپسول (درصد)

اندازه‌گیری میزان ترکیبات پلی‌فروکتوز (فروکتان) و شناسایی کربوهیدرات‌های موجود در عصاره

میزان کل فروکتان‌ها توسط معرف resorcinol-thiourea و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و نتایج به‌صورت گرم فروکتوز در ۱۰۰ گرم وزن خشک (DW) بیان شد. شناسایی کربوهیدرات‌های عصاره نیز توسط دستگاه HPLC (Hitachi, Japan) Elite Chrome مدل Chromaster 5450 که در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد کار می‌کند، انجام شد. جداسازی با فاز متحرک H_2O تقطیر شده بر روی ستون Shodex Sugar SP0810 (300×8 میلی‌متر) با یک ستون

۷۲ ساعته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، کلنی‌ها شمارش شده و به صورت $\log \text{CFU/mL}$ گزارش شدند (Daneshi et al., 2013).

اندازه‌گیری اسیدیت و pH

برای اندازه‌گیری pH، دستگاه pH متر به ترتیب توسط محلول بافر $\text{pH}=7$ و محلول بافر $\text{pH}=4$ کالیبره شد. سپس، مقداری از نمونه در یک بشر خشک و تمیز ریخته شده و الکتروود دستگاه pH متر درون آن قرار گرفت. دمای pH متر با توجه به دمای نمونه تنظیم گردید. پس از ثابت شدن عدد، pH نمونه قرائت شد (ISIRI, 2007). برای تعیین اسیدیت نمونه‌های آبمیوه نیز ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر تازه جو شیده و سرد شده به یک ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل و ۲۰ گرم نمونه آبمیوه به آن اضافه گردید. سپس شنا ساگر فنل فتالین (به میزان ۰/۳ میلی‌لیتر فنل فتالین برای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نمونه) به آن افزوده شده و با محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال، تا ایجاد رنگ صورتی کم رنگ پایدار (به مدت ۳۰ ثانیه)، تیترا شد. میزان اسیدیت از طریق رابطه ۲ محاسبه گردید.

$$A = \frac{V \times 0.064 \times 100}{m} \quad (2)$$

در این رابطه V حجم مصرفی هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال بر حسب میلی‌لیتر، m وزن نمونه بر حسب گرم و A اسیدیت کل بر حسب گرم اسید سیتریک در صد گرم نمونه می باشد (ISIRI, 2007).

کدورت

برای اندازه‌گیری کدورت نمونه‌های نوشیدنی از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر استفاده شده و کدورت نمونه‌ها بر حسب NTU گزارش شد (Santos et al., 2019).

ویسکوزیته

برای اندازه‌گیری ویسکوزیته از ویسکومتر بروکفیلد ساخت کشور انگلستان استفاده شد. بدین صورت که نمونه‌های نوشیدنی درون محفظه استوانه‌ای ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و از اسپیندل شماره ۶۱ استفاده شد. با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، اسپیندل مناسب جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته، اسپیندلی است که در سرعت مورد نظر گشتاوری بالاتر از ۱۰ درصد را نشان دهد. در دمای اندازه‌گیری ۲۲/۷ درجه سلسیوس، اسپیندل ۶۰ متصل به دستگاه در داخل مخزن قرار داده شد و در ۵۰ دور در دقیقه، با رسیدن نرخ برش دستگاه به ۵۰

توزیع اندازه ذرات

اندازه ذرات با استفاده از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی^۱ (Shimadzu، ژاپن) اندازه‌گیری شد. تقریباً ۵ گرم نمونه در ۵۰ میلی‌لیتر هگزان در دمای محیط مخلوط شد و سپس نمونه به مدت ۲ دقیقه توسط اولتراسونیک پراکنده شد تا از تعلیق جداگانه آن اطمینان حاصل شود. نتایج به دست آمده از دستگاه برای استخراج و گزارش پارامترهای بزرگترین (D_{90}) و کوچکترین (D_{10}) اندازه ذرات در مقیاس میکرومتر استفاده شد (Junior et al., 2018).

ساختار مورفولوژی کپسول‌ها

برای بررسی ریزساختار یا مورفولوژی کپسول‌های تولیدی، از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۲ (LEO 1450, Germany) با بزرگنمایی ۳۰۰۰ برابر استفاده گردید. نمونه‌ها به وسیله دستگاه پوشش‌دهنده با لایه‌ای از طلا پوشیده شده و سپس از سطح خارجی نمونه‌های آماده‌سازی شده در ولتاژ ۱۵ kv تصویربرداری شد (Badfarsa et al., 2017).

محتوی فنل کل کپسول‌ها

محتوای فنل کل نمونه‌های کپسول بر اساس روش فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره ریزپوشانی شده با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو مخلوط شد و به مدت ۳ دقیقه در حالت سکون باقی ماند تا واکنش صورت گرفت. سپس ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه شده و بعد از یک دقیقه، با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در مکانی تاریک نگهداری گردید و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر در برابر شاهد قرائت شد. میزان ترکیبات فنولی کل نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده با اسید گالیک و معادله حاصل ($y=0.1554x-0.1456$) تعیین گردید (Huang & Yang, 2011).

زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

در ابتدا نمونه‌ها در محلول استریل رینگر رقیق شده و گونه پروبیوتیک زنده لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس توسط کشت پورپلیت بر روی محیط کشت MRS Agar ارزیابی شدند. آنتی‌بیوتیک مورد استفاده به عنوان استاندارد و نکوماکسین^۳ بود. پلیت‌ها در ظروف در بسته به صورت بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند و برای کنترل شرایط بی‌هوازی، از یک شنا ساگر بی‌هوازی استفاده شد. پس از انکوباسیون

(یک بر ثانیه) عدد مربوط به ویسکوزیته قرائت گردید (Zokti James et al., 2016).

عدد فرمالین

۲۵ میلی لیتر آب میوه (V_0) به یک بشر منتقل شد. یک عدد مگنت داخل بشر قرار داده و بشر روی همزن مغناطیسی گذاشته شد و در حال به هم زدن، تا رسیدن به $pH = 8/1$ ، هیدروکسید سدیم $0/1$ نرمال قطره قطره به آن اضافه گردید. سپس 10 میلی لیتر محلول فرمالدئید خنثی، در حال به هم زدن به آن اضافه شده و به مدت یک دقیقه با هم مخلوط شدند. سپس تا رسیدن به $pH = 8/1$ ، هیدروکسید سدیم $0/25$ N قطره قطره به آن اضافه گردید (V). مقدار عددی فرمالین از طریق رابطه ۳ محاسبه گردید (ISIRI, 2007).

$$F \text{ (mg/kg)} = \frac{V \times N \times 10 \times 100}{V_0} \quad (3)$$

فعالیت آنتی اکسیدانی

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های نوشیدنی بر اساس ارزیابی ظرفیت چلات کنندگی رادیکال آزاد بود. در این روش، برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی نوشیدنی ها، از $2,2$ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید. بدین منظور، 100 میکرو لیتر آب میوه در نسبت 1 به 10 توسط متانول رقیق شد و سپس با 2 میلی لیتر $DPPH$ mol/L در متانول مخلوط گردید. پس از انکوباسیون به مدت 30 دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق، جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 517 nm قرائت شده و فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از رابطه ۴ محاسبه گردید (Huang & Yang, 2011).

$$DPPH \text{ (\%)} = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100 \quad (4)$$

خواص حسی

ارزیابی حسی نوشیدنی ها (طعم، رنگ، بو و پذیرش کلی) به روش هدونیک ۹ نقطه ای و با تکمیل پرسشنامه ارزیابی، توسط ۱۰ نفر ارزیاب آموزش دیده انجام شد (Daneshi et al., 2013).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

تحقیق حاضر در دو مرحله انجام شد، در مرحله اول ریزپوشانی عصاره ریشه بابا آدم با دو روش میکروکپسولاسیون و نانوکپسولاسیون و با استفاده از دو ترکیب مالتودکسترین و صمغ عربی به عنوان پوشش دیواره انجام شد. در مرحله دوم از عصاره ریزپوشانی شده (در سطوح $0/5$ و 1 درصد) به همراه عصاره آزاد در فرمولاسیون نوشیدنی پروبیوتیک آب پرتقال- هویج استفاده و اثر آن بر زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک و همچنین ویژگی های فیزیکی و شیمیایی و حسی محصول نهایی مورد بررسی قرار گرفت. تمام آزمایشات بر اساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد و نتایج، حاصل میانگین حداقل سه تکرار بود. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری Minitab 16.0 تجزیه واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف بین میانگین ها با آزمون دانکن در سطح احتمال $p < 0/05$ تعیین شد.

نتایج و بحث

محتوای کل ترکیبات پلی فروکتوز اندازه گیری شده و همچنین کربوهیدرات های شناسایی شده در عصاره آبی ریشه گیاه بابا آدم در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود اینولین، فروکتوالیگوساکاریدها (Nystose و 1-Kestose) و انواع قندها (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) شناسایی شدند. محتوای کل فروکتان های عصاره برابر $12/9 \pm 0/88$ g/100g DW اندازه گیری شد که حدود 75 درصد آن $9/75 \pm 0/65$ g/100g DW به اینولین تعلق دارد (جدول ۲). فروکتوالیگوساکاریدهای Nystose و 1-Kestose که ترکیبات تجزیه شده حاصل از فروکتان ها هستند نیز به ترتیب به میزان $0/18 \pm$ و $0/88 \pm$ g/100g DW شناسایی شدند. محتوای اینولین و فروکتوالیگوساکاریدها در عصاره ریشه بابا آدم بر اساس شرایط آب و هوایی، منطقه جغرافیایی، زمان برداشت، شرایط نگهداری، نوع حلال به کار رفته برای استخراج عصاره و شرایط استخراج می تواند متفاوت باشد (Cao et al., 2018). Petkova و همکاران (۲۰۲۰) میزان اینولین، Nystose و 1-Kestose عصاره ریشه گیاه بابا آدم مربوط به کشور بلغارستان را به ترتیب $0/7$ ، $0/2$ و $0/1$ g/100g DW گزارش دادند (Petkova et al., 2020). در حالیکه Cao و همکاران (۲۰۱۸) و Bagaoutdinova و همکاران (۲۰۰۱) محتوای اینولین عصاره ریشه بابا آدم کشورهای کره جنوبی و روسیه را به ترتیب 9 و $g/100g$ DW ۳۰ گزارش کردند (Bagaoutdinova et al., 2001; Cao et al., 2018).

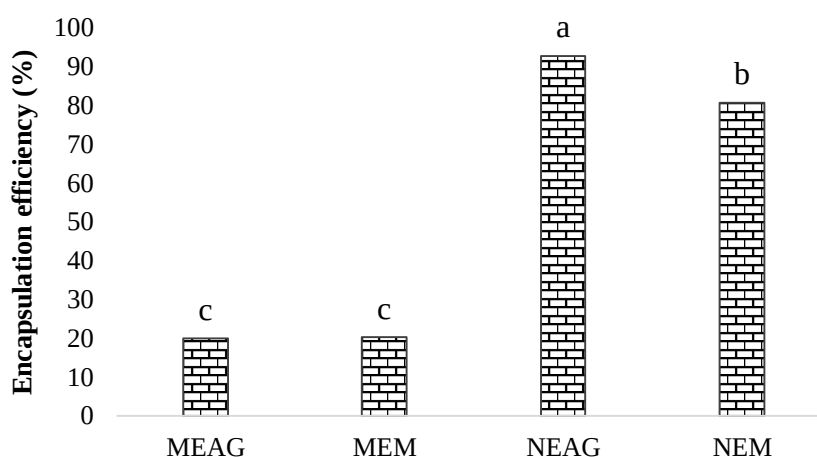
جدول ۲- محتوای پلی فروکتوزها و آنالیز کربوهیدرات‌های عصاره بر حسب (g/100g DW)

Table 2- Polyfructoses content and analysis of carbohydrates of the extract in (g/100g DW)

ترکیب	ترکیبات پلی فروکتوز (فروکتان)	ایتولین	فروکتوز	ساکاروز	Nystose	1-Kestose	گلوکز
مقدار	12.90± 0.88	9.75± 0.65	1.55± 0.12	1.08± 0.09	0.88± 0.18	0.53± 0.08	1.23± 0.21

ارزیابی ویژگی‌های میکروکپسول و نانوکپسول‌ها راندمان فرایند ریز پوشانی

یکی از اولین ویژگی‌هایی که در مورد فرایند ریز پوشانی مدنظر است، تعیین کارایی یا بازده کپسولاسیون می‌باشد، تا به نوعی به مؤثر بودن فرایند به‌کار رفته جهت تهیه کپسول‌ها پی برد. به‌طور کلی بازده کپسولاسیون نشان می‌دهد که چه مقدار از عصاره اولیه به‌کار رفته، در کپسول‌ها بارگذاری شده است (Cheraghali et al., 2016). نتایج



شکل ۱- راندمان میکروکپسولاسیون و نانوکپسولاسیون عصاره ریشه بابا آدم با استفاده از مالتودکسترین و صمغ عربی
Fig. 1. Microencapsulation and nanoencapsulation efficiency of burdock root extract using maltodextrin and Arabic gum
*میکروکپسول تهیه شده با صمغ عربی (MEGA)، میکروکپسول تهیه شده با مالتودکسترین (MEM)، نانوکپسول تهیه شده با صمغ عربی (NEAG)، نانوکپسول تهیه شده با مالتودکسترین (NEM)

محققین دریافتند که با افزایش درصد صمغ عربی در ترکیب با مالتودکسترین، کارایی کپسولاسیون افزایش یافت که این امر در ارتباط با خاصیت امولسیفایری و پایدارسازی صمغ عربی دانسته شد. Akhavan Mahdavi و همکاران (۲۰۱۶) نیز به تولید کپسول‌های عصاره زرشک با استفاده از خشک‌کن پاششی پرداخته و از صمغ عربی، مالتودکسترین و ژلاتین به‌عنوان مواد پوشش‌دهی استفاده کردند و بالاترین بازده کپسولاسیون و بهترین کیفیت پودر را مربوط به کپسول‌های تهیه شده با ترکیب مالتودکسترین و صمغ عربی دانستند و بازده این کپسول‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر از کپسول‌های تهیه شده با مالتودکسترین به تنهایی بود (Akhavan Mahdavi et al., 2016).

بازده بالای کپسول‌های تولیدی با صمغ عربی در ارتباط با ساختار آن است. این صمغ یک هتروپلیمر قندها با انشعابات بالاست و حاوی تعداد کمی پروتئین است که به‌طور کووالانت به زنجیره‌های کربوهیدرات متصل شده‌اند و به‌عنوان یک عامل تشکیل‌دهنده فیلم عالی عمل کرده و بنابراین به‌خوبی می‌توان مولکول‌های هسته را به‌دام اندازد (Burin et al., 2011). کارایی پایین‌تر مالتودکسترین احتمالاً به دلیل عدم ظرفیت امولسیفایری و قابلیت فیلم‌سازی پایین آن می‌باشد (Akhavan Mahdavi et al., 2016). در تحقیقاتی مشابه Akdeniz و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که نوع ماده مورد استفاده برای پوشش‌دهی کپسول‌های حاوی ترکیبات فنولی پوست پیاز، اثر قابل توجهی بر بازده کپسولاسیون داشت (Akdeniz et al., 2017). این

توزیع اندازه ذرات کپسول‌ها

اندازه ذرات و توزیع آن‌ها نقش مهمی در ویژگی‌های فیزیکی سیستم‌های کلوئیدی مانند پایداری طی نگهداری، کدورت و ویژگی‌های رئولوژیکی دارد، همچنین بر ویژگی‌هایی مانند دسترسی زیستی، خواص ارگانولپتیکی و حسی فرآورده‌های غذایی حاوی آن موثر است (Ballesteros et al., 2017). نتایج تعیین اندازه کپسول‌ها توسط آزمون DSL نشان داد که فرایند ریزپوشانی و همچنین نوع عوامل پوشش دهی بر قطر ذرات کپسول‌ها موثر است، به‌طوری که بر اساس پارامترهای ترکیبی برای توزیع اندازه ذرات (D90) متوسط قطر ذرات نانوکپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی کوچکتر بود و میکروکپسول‌های تهیه شده با مالتودکسترین بیشترین قطر ذرات را نشان دادند (جدول ۳). قطر ذرات میکروکپسول به خصوصیات ماده، غلظت، ویسکوزیته مواد ریزپوشانی و شرایط عملیات خشک‌کن بستگی دارد (Junior et al., 2018). Tadros و همکاران (۲۰۰۴) گزارش

کردند که کاهش اندازه ذرات ثبات در برابر ته‌نشینی را فراهم کرده و برای کاربردهای غذایی مناسب می‌باشد (Tadros et al., 2004). توزیع اندازه ذرات از آن جهت حائز اهمیت است که می‌توان با بهینه‌سازی آن و بدون تغییر کلی در فرمولاسیون فرآورده غذایی به ویژگی‌های مطلوب حسی و رئولوژیکی رسید (Mahmoud et al., 2016). Badfarsa و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند که نوع ماده مورد استفاده برای تهیه میکروکپسول‌ها اثر معنی‌داری بر اندازه ذرات داشت، به‌طوری که اندازه ذرات کپسول‌های تهیه شده با کازئینات سدیم بیشتر از انواع تهیه شده با بتاسیکلودکسترین بود (Badfarsa et al., 2017). Mahmoud و همکاران (۲۰۱۶) نیز دریافتند که نوع ماده مورد استفاده برای نانوکپسولاسیون عصاره پوست لیمو و پرتقال، اثر قابل توجهی بر اندازه ذرات داشت، به‌طوری که بین آلژینات و مالتودکسترین به‌عنوان ماده پوشش‌دهی، کپسول‌های تهیه شده با آلژینات اندازه ذرات کوچکتری نشان دادند (Mahmoud et al., 2016).

جدول ۳- اندازه ذرات میکروکپسول و نانوکپسول‌های عصاره ریشه باب‌آدم
Table 3- Particle size of burdock root extract microencapsules and nanoencapsules
توزیع اندازه ذرات (μm)

Particle size (μm)			نمونه
D90	D50	D10	
16.86± 0.15	6.23± 0.15	1.68 ±0.01	MEAG
15.50± 0.15	5.69 ±0.18	1.63± 0.01	MEM
14.33 ± 0.15	5.55± 0.21	±1.72± 0.10	NEAG
15.72± 0.15	5.61 ±0.12	1.83±0.12	NEM

*میکروکپسول تهیه شده با صمغ عربی (MEGA)، میکروکپسول تهیه شده با مالتودکسترین (MEM)، نانوکپسول تهیه شده با صمغ عربی (NEAG)، نانوکپسول تهیه شده با مالتودکسترین (NEM)

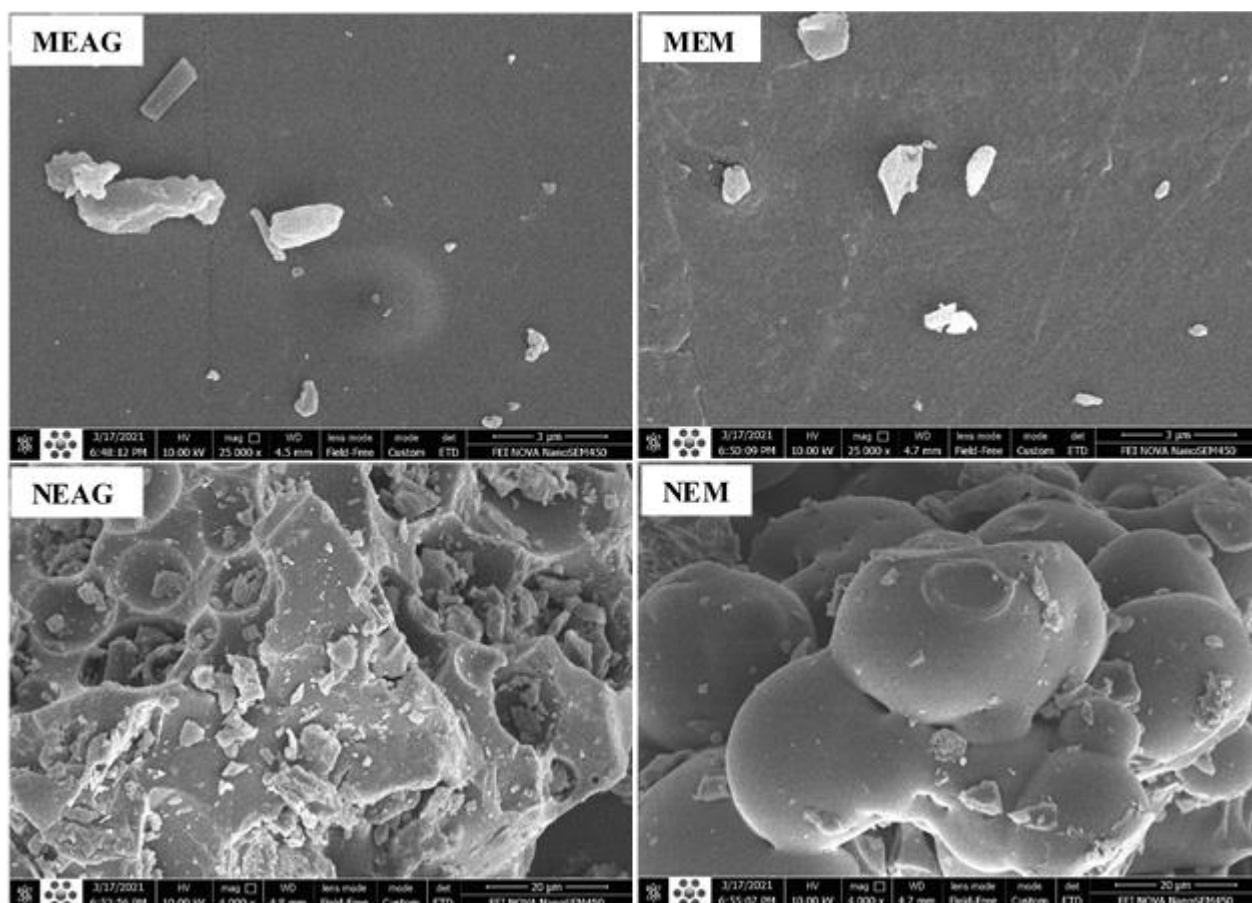
ریزساختار کپسول‌ها

مطالعه ریخت‌شناسی یا مورفولوژی ذرات کپسول با SEM اطلاعات ارزشمندی در مورد ویژگی‌های سطحی و تأثیر اجزای تشکیل‌دهنده دیواره کپسول بر ریز ساختار ذرات و همچنین شرایط خشک شدن و عوامل شیمیایی و فیزیکی موثر بر ساختار ذرات ارائه می‌دهد (Papoutsi et al, 2018). ریزساختار نمونه‌های میکرو و نانوکپسول تولیدی در پژوهش حاضر نشان داد که میکروکپسول‌های تهیه شده با عوامل پوشش‌دهی صمغ عربی و مالتودکسترین دارای سطوح ورقه‌ای‌مانند، ناصاف، نامنظم، شکستگی و گوشه‌دار بوده و به صورت پراکنده بودند. نانوکپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی نیز سطوح صافی نداشته و تجمع بالایی نشان دادند و به صورت گوشه‌دار و دارای شکستگی بودند، در حالی که نانوکپسول‌های تهیه شده با مالتودکسترین سطوح کروی و نسبتاً صافی داشته و تجمع ذرات نیز در آن‌ها مشاهده می‌گردد (شکل ۲). به‌طور کلی، تشخیص مکانیسم

دقیق و علت اصلی بروز تغییرات در شکل ظاهری و ویژگی‌های سطحی کپسول‌ها نیاز به تحقیقات و مطالعات گسترده‌تری دارد، با این حال، تفاوت در شکل ظاهری و کیفیت سطحی کپسول‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت بین قدرت پوشاندگی و ساختار فضایی صمغ عربی و مالتودکسترین باشد (Ballesteros et al., 2017). ایجاد چین و چروک‌ها و ناهموازی‌های سطحی و حفرات در سطح کپسول‌ها، احتمالاً نشان‌دهنده اثر تنش‌های مکانیکی ناشی از شرایط خشک کردن بر مواد دیواره می‌باشد. ترکیب دیواره و سرعت خشک کردن به ویژه در مراحل اولیه، می‌توانند بر ویژگی‌های سطحی ریز ساختار مواد انکپسوله شده اثرگذار باشند (Akhavan Mahdavi et al., 2016). در تحقیقاتی مشابه Sharifi و همکاران (۲۰۱۵) آنتوسیانین‌های میوه زرشک را توسط خشک‌کن پاششی انکپسوله کردند و مشاهده نمودند که کپسول‌های تهیه شده با نسبت مساوی مالتودکسترین و صمغ عربی، بهترین ریزساختار و خصوصیات فیزیکی را داشت (Sharifi et

محصولات فرعی مرکبات داشت. این محققین اظهار داشتند که در روش خشک کردن پاششی، ذرات کروی با قطرهای مختلف و با حالت مقعر تشکیل شدند، در حالی که پودرهای تولید شده توسط خشک کردن انجمادی، دارای ساختار ورقه‌ای مانند یا شبیه شیشه شکسته بودند. این محققین همچنین دریافتند که نوع ماده پوشش‌دهی بر ریزساختار کپسول‌ها تأثیر داشت (Papoutsi et al, 2018).

Ballesteros et al., 2015) و همکاران (۲۰۱۷) نیز در بررسی انکپسولاسیون ترکیبات فنولی قهوه با مالتودکسترین و صمغ عربی به عنوان عامل پوشش‌دهی و توسط روش خشک‌کن پاششی به نتایج مشابهی دست یافتند و کپسول‌های آن‌ها نیز کروی مانند و با حالت مقعر بود (Ballesteros et al., 2017). Papoutsis و همکاران (۲۰۱۸) نیز بیان کردند که روش مورد استفاده برای انکپسولاسیون، اثر قابل توجهی بر مرفولوژی کپسول‌های تولیدی حاوی عصاره



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) کپسول‌های عصاره ریشه بابا آدم

Fig. 2. The electron microscope images (SEM) of burdock root extract capsules

*میکروکپسول تهیه شده با صمغ عربی (MEGA)، میکروکپسول تهیه شده با مالتودکسترین (MEM)، نانوکپسول تهیه شده با صمغ عربی (NEAG)، نانوکپسول تهیه شده با مالتودکسترین (NEM)

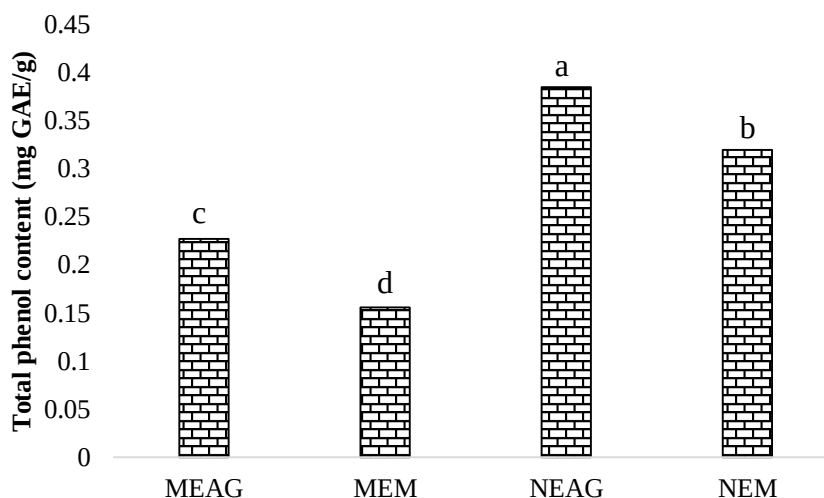
میکروکپسول‌ها داشتند ($p < 0.05$). محتوای فنول کل کپسول‌های تولیدی در این تحقیق در محدوده ۰/۳۸۵ - ۰/۱۵۶ mg GAE/g قرار داشت (شکل ۳). کمتر بودن محتوای فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میکروکپسول‌های عصاره ریشه بابا آدم نسبت به نانوکپسول‌ها احتمالاً در ارتباط با تفاوت در روش مورد استفاده برای خشک کردن آن‌ها بر می‌گردد. برای تهیه میکروکپسول‌ها از خشک‌کن پاششی و برای تولید نانوکپسول‌ها از خشک‌کن انجمادی

محتوای فنول کل کپسول‌ها

نتایج حاصل از بررسی محتوای فنول کل نمونه‌های مختلف میکرو و نانوکپسول‌های تولیدی در پژوهش حاضر نشان داد که هم در فرآیند میکروکپسولاسیون و هم فرآیند نانوکپسولاسیون، کپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی دارای محتوای بالاتر فنول کل نسبت به کپسول‌های تهیه شده با مالتودکسترین بودند ($p < 0.05$). همچنین، نانوکپسول‌های تولیدی فنول کل بالاتری نسبت به

استفاده گردید. در خشک کن پاششی، به دلیل دمای بالای بخش تزریق کننده، بخشی از ترکیبات فنولی عصاره تخریب شده و فعالیت آنتی اکسیدانی نیز کاهش می یابد (Jia et al., 2016). در خشک کن انجمادی نیز بخشی از ترکیبات فنولی در اثر استرس های انجماد و خشک کردن تخریب می شوند (Papoutsi et al., 2018)، ولی ظاهراً در پژوهش حاضر تخریب ترکیبات توسط خشک کن پاششی بالاتر از خشک کن انجمادی بوده است.

و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات فنولی میوه تم شک شمالی را با مواد دیواره مختلف کپسوله کردند و بهترین نتایج را با استفاده از مالتودکسترین به عنوان پوشش گزارش کردند (Tonon et al., 2008).



شکل ۳- مقایسه محتوای فنول کل (mg GAE/g) میکرو و نانوکپسول های عصاره ریشه بابا آدم

Fig. 3. Comparison of total phenol content (mg GAE/g) of burdock root extract micro and nanoencapsules
*میکروکپسول تهیه شده با صمغ عربی (MEGA)، میکروکپسول تهیه شده با مالتودکسترین (MEM)، نانوکپسول تهیه شده با صمغ عربی (NEAG)، نانوکپسول تهیه شده با مالتودکسترین (NEM)

دوره نگهداری در نوشیدنی ها، به دلیل تغییرات اسیدیته، حضور اکسیژن یا کاهش سطح ترکیبات نیتروژنی می باشد. قابلیت رشد و بقا میکروارگانیسم ها به طور زیادی وابسته به تطبیق پذیری آن ها با محیط زیست دارد (Lacroix & Yildirim, 2007). کاهش در فعالیت آنتی اکسیدانی نوشیدنی ها طی دوره نگهداری نیز یکی از دلایل کاهش تعداد پروبیوتیک های زنده گزارش شده است (Yoon et al., 2005). و همکاران (۲۰۱۶) با تولید آب گوجه فرنگی و آب هویج پروبیوتیک مشاهده کردند که در طی ۷ هفته نگهداری در دمای یخچال، تعداد باکتری های پروبیوتیک در نوشیدنی ها کاهش یافت، ولی تا روز آخر همچنان تعداد سلول های زنده پروبیوتیک ها در حد قابل قبول بود (Naga Sivudu et al., 2016).

افزودن فرم های مختلف عصاره و افزایش سطح آن ها منجر به افزایش قابل توجه قابلیت زنده ماندن پروبیوتیک ها در نوشیدنی های

ارزیابی پارامترهای نوشیدنی سین بیوتیک آب پرتقال-هویج

زنده ماندن پروبیوتیک ها

نتایج حاصل برر سی زنده ماندن پروبیوتیک ها در نوشیدنی ترکیبی آب پرتقال- هویج نشان داد که در روز اول، بین تعداد پروبیوتیک ها در تیمارهای مختلف نوشیدنی اختلاف معنی داری وجود نداشت و تعداد این باکتری ها در محدوده $\log \text{CFU/ml}$ $8.63 - 8.58$ قرار داشت. طی دوره نگهداری در کلیه تیمارهای نوشیدنی، تعداد باکتری های پروبیوتیک کاهش نشان داد ($p < 0.05$) و بیشترین شدت کاهش پروبیوتیک ها در نمونه شاهد مشاهده گردید (جدول ۴). محققین، کاهش پروبیوتیک ها در آب میوه طی دوره انبارمانی را به کاهش pH و افزایش اسیدیته نسبت دادند (Yoon et al., 2005). محققین همچنین اظهار داشتند که کاهش در بقا پروبیوتیک ها طی

تولیدی گردید ($p < 0.05$). ریزپوشانی عصاره نیز قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در نوشیدنی‌ها را افزایش داد و بیشترین تأثیر مربوط به نانوکپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی در سطح ۱ درصد بود و نانوکپسول صمغ عربی در سطح ۰/۵ درصد و نانوکپسول مالتودکسترین در سطح ۱ درصد پس از آن قرار داشتند. مکانیسم اصولی حفاظت پروبیوتیک‌ها توسط اینولین طی دوره نگهداری در یخچال، به‌طور زیادی در ارتباط با این حقیقت است که اینولین به‌عنوان منبع کربنی در دسترس برای حفظ سلول به کار رفته و

جدول ۴- مقایسه زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک (Log CFU/ml) در تیمارهای مختلف نوشیدنی سین‌بیوتیک بر پایه آب پرتقال-هویج طی دوره نگهداری

Table 4- Comparison of the probiotic bacteria survival (Log CFU/ml) in different symbiotic beverage treatments based on orange-carrot juice during storage period

زمان نگهداری (روز)				
Storage time (Day)				
30	20	10	1	
5.40± 0.07 ^{D,i}	6.78± 0.04 ^{C,i}	7.46± 0.04 ^{B,h}	8.60± 0.05 ^{A,a}	Ctrl
6.14± 0.02 ^{D,h}	6.91± 0.04 ^{C,h}	7.70± 0.05 ^{B,g}	8.61± 0.02 ^{A,a}	T1
6.26± 0.02 ^{D,g}	7.33± 0.01 ^{C,f}	7.96± 0.02 ^{B,e}	8.60± 0.03 ^{A,a}	T2
6.42± 0.03 ^{D,f}	7.25± 0.01 ^{C,g}	7.79± 0.03 ^{B,g}	8.59± 0.03 ^{A,a}	T3
6.89± 0.02 ^{D,d}	7.48± 0.04 ^{C,e}	8.07± 0.01 ^{B,d}	8.56± 0.03 ^{A,a}	T4
6.91± 0.02 ^{D,d}	7.61± 0.07 ^{C,d}	7.89± 0.03 ^{B,f}	8.56± 0.03 ^{A,a}	T5
7.09± 0.04 ^{D,b,c}	7.80± 0.04 ^{C,c}	8.15± 0.01 ^{B,c}	8.56± 0.04 ^{A,a}	T6
6.82± 0.04 ^{D,e}	7.58± 0.03 ^{C,d}	7.93± 0.04 ^{B,e,f}	8.58± 0.05 ^{A,a}	T7
7.03± 0.03 ^{D,c}	7.94± 0.02 ^{C,b}	8.17± 0.01 ^{B,c}	8.61± 0.06 ^{A,a}	T8
7.10± 0.02 ^{D,b}	7.91± 0.02 ^{C,b}	8.21± 0.02 ^{B,b}	8.59± 0.06 ^{A,a}	T9
7.38± 0.01 ^{D,a}	8.07± 0.01 ^{C,a}	8.33± 0.01 ^{B,a}	8.63± 0.04 ^{A,a}	T10

*حروف لاتین بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر هر ردیف در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد (مقایسه تغییرات هر تیمار طی زمان).

*حروف لاتین کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد (مقایسه تیمارها در هر زمان ثابت).

آب انجیر با اینولین و لاکتوباسیلوس دلبروکی پرداخته و نشان دادند که با گذشت زمان تعداد سلول‌های زنده باکتری پروبیوتیک در نوشیدنی‌ها به‌طور قابل توجهی کاهش یافت به‌طوری که پس از ۴ هفته نگهداری در یخچال شمارش آن به 6.59 Log cfu/ml رسید، در حالیکه استفاده از اینولین به‌عنوان پری‌بیوتیک توانست تعداد پروبیوتیک‌های زنده مانده را تا پایان نگهداری افزایش دهد (Log cfu/ml ۷/۴۹)، که با نتایج پژوهش حاضر کاملاً مطابقت دارد (Khezri et al., 2018). Pimentel و همکاران (۲۰۱۵) نیز در بررسی بقاء لاکتوباسیلوس پاراکازئی در آب سیب گزارش کردند که طی دوره نگهداری ۲۸ روزه در دمای یخچال، تعداد پروبیوتیک‌ها در تیمارهای نوشیدنی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، ولی تعداد آن در نوشیدنی سین‌بیوتیک حاوی پری‌بیوتیک اولیگوفروکتوز همواره بالاتر از نوشیدنی پروبیوتیک بود (Pimentel et al., 2015).

به‌منظور بهره‌مندی از خواص سلامتی بخش باکتری‌های پروبیوتیک، حداقل سلول زنده توصیه شده در فرآورده‌ها cfu/ml $10^6 - 10^7$ تعیین شده است (Lebaka et al., 2018). بنابراین، زنده‌مانی کشت پروبیوتیک در طول دوره نگهداری از اهمیت زیادی برخوردار است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که همه تیمارهای مورد مطالعه به استثنای شاهد، تا روز آخر انبارمانی دارای تعداد پروبیوتیک‌ها در حد مطلوب بود، ولی در نمونه شاهد تا روز بیستم تعداد پروبیوتیک‌ها تا حد مطلوب بود و در روز سی‌ام به کمتر از تعداد توصیه شده رسید. نتایج حاصله توسط Sheehan و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی قابلیت زیستی خوبی در نوشیدنی‌های میوه‌ای داشته و در آب پرتقال بیش از 10^7 cfu/ml و در آب آناناس بیش از 10^6 cfu/ml به مدت ۱۲ هفته باقی ماندند (Sheehan et al., 2007). Khezri و همکاران (۲۰۱۸) به غنی‌سازی

اسیدیتة کل

مقادیر pH و اسیدیتة، از عوامل مهم در تهیه یک فرآورده پروبیوتیکی محسوب می‌شوند، زیرا کاهش pH در مدت زمان نگهداری محصول با افزایش اسیدیتة توسط باکتری‌ها همراه است. همچنین بیشترین اسید تولید شده، اسید لاکتیک می‌باشد. میزان تولید اسید در محصولات غذایی باید در حد مطلوب باشد تا بر طعم و مزه فرآورده تأثیر نامطلوب نگذارد (Bruno et al., 2009). علاوه بر این، pH یکی از مهم‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک است (Souri et al., 2019). نتایج حاصل از بررسی اسیدیتة کل تیمارهای مختلف نوشیدنی آب پرتقال-هویج سین‌بیوتیک نشان داد که در روز اول، میانگین مقادیر اسیدیتة کل نوشیدنی‌های تولیدی در محدوده ۰/۹۵۴-۰/۸۲۸ در صد قرار داشت (جدول ۵). با افزایش غلظت فرم‌های مختلف عصاره ریشه باب‌آدم در

نوشیدنی‌ها، میزان اسیدیتة کل کاهش یافت، در حالیکه طی دوره نگهداری در کلیه تیمارهای نوشیدنی، مقادیر اسیدیتة کل به تدریج افزایش نشان داد ($p < 0.05$). افزایش اسیدیتة نوشیدنی‌ها طی دوره نگهداری به دلیل مصرف قند توسط باکتری‌ها و تولید اسید، می‌باشد. افزایش اسیدیتة در روزهای اول انبارمانی با سرعت بیشتری صورت گرفت که به تعداد بالاتر باکتری‌های پروبیوتیک در محصول مربوط می‌شود. در روزهای پایانی به دلیل حضور تعداد کمتر باکتری‌های پروبیوتیک در نوشیدنی‌ها، قابلیت تولید اسید نیز کاهش یافته است. به‌طور کلی، به استثناء تیمار حاوی ۱ درصد میکروکپسول تهیه شده با صمغ عربی، سایر تیمارهای حاوی میکرو و نانوکپسول‌های عصاره ریشه باب‌آدم دارای مقادیر اسیدیتة بالاتری نسبت به شاهد بودند (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه مقادیر اسیدیتة کل (%) تیمارهای مختلف نوشیدنی سین‌بیوتیک بر پایه آب پرتقال-هویج طی دوره نگهداری
Table 5- Comparison of the acidity values (%) of different symbiotic beverage treatments based on orange-carrot juice during storage period

زمان نگهداری (روز) Storage time (Day)				
30	20	10	1	
1.02 ± 0.00 ^{A,ef}	1.03 ± 0.00 ^{A,d}	1.03 ± 0.00 ^{A,c}	0.87 ± 0.00 ^{B,c}	Ctrl
1.03 ± 0.01 ^{A,de}	1.03 ± 0.00 ^{B,e}	0.99 ± 0.00 ^{C,d}	0.85 ± 0.00 ^{C,cd}	T1
1.02 ± 0.00 ^{A,f}	1.00 ± 0.00 ^{B,f}	0.98 ± 0.00 ^{C,d}	0.83 ± 0.00 ^{D,d}	T2
1.09 ± 0.00 ^{A,b}	1.07 ± 0.00 ^{B,a}	1.06 ± 0.00 ^{C,a}	0.88 ± 0.00 ^{D,b}	T3
1.07 ± 0.00 ^{A,c}	1.04 ± 0.00 ^{B,cd}	1.03 ± 0.00 ^{C,bc}	0.86 ± 0.00 ^{D,c}	T4
1.09 ± 0.00 ^{A,b}	1.06 ± 0.00 ^{B,b}	1.02 ± 0.00 ^{C,c}	0.86 ± 0.00 ^{D,c}	T5
1.02 ± 0.00 ^{A,ef}	1.01 ± 0.00 ^{B,e}	0.98 ± 0.00 ^{C,d}	0.84 ± 0.00 ^{D,d}	T6
1.12 ± 0.00 ^{A,a}	1.07 ± 0.00 ^{B,a}	1.07 ± 0.00 ^{B,a}	0.95 ± 0.01 ^{C,a}	T7
1.09 ± 0.00 ^{A,b}	1.05 ± 0.00 ^{B,bc}	1.02 ± 0.00 ^{C,c}	0.89 ± 0.00 ^{D,b}	T8
1.09 ± 0.01 ^{A,b}	1.07 ± 0.00 ^{B,a}	1.03 ± 0.00 ^{C,b}	0.88 ± 0.00 ^{D,b}	T9
1.05 ± 0.0 ^{A,d}	1.05 ± 0.00 ^{A,c}	1.03 ± 0.00 ^{B,bc}	0.86 ± 0.00 ^{C,c}	T10

*حروف لاتین بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر هر ردیف در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد (مقایسه تغییرات هر تیمار طی زمان).

*حروف لاتین کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد (مقایسه تیمارها در هر زمان ثابت).

Liong و Yeo (۲۰۱۰) نشان دادند که افزودن اینولین به شیر سویا به‌طور معنی‌داری سبب افزایش تولید اسید توسط پروبیوتیک‌ها در مقایسه با نمونه شاهد گردید (Liong and Yeo, 2010). Rafigh و همکاران (۲۰۱۶) آب هویج پروبیوتیک را با استفاده از سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتراروم، کازئی، سیدوفیلوس و بیفیدوم لانگوم تولید کرده و مشاهده نمودند که در طی دوره نگهداری، میزان pH نوشیدنی‌ها کاهش و اسیدیتة قابل‌تیراسیون افزایش پیدا کرد (Rafigh et al., 2016). Khezri و همکاران (۲۰۱۸) افزایش میزان اسیدیتة در آب انجیر پروبیوتیک طی دوره نگهداری را مشاهده کردند و بیان نمودند که مقادیر اسیدیتة آب انجیر سین‌بیوتیک حاوی اینولین

بالاتر بودن میزان اسیدیتة در نوشیدنی‌های حاوی کپسول‌های عصاره ریشه باب‌آدم، احتمالاً به دلیل نقش پری‌بیوتیکی اینولین موجود در این عصاره می‌باشد که موجب افزایش قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در نوشیدنی‌ها شده و در نتیجه تولید اسید در نمونه‌ها افزایش یافته است. محققین اظهار داشتند که این موضوع به دلیل نقش تنظیم‌کنندگی فعالیت متابولیکی باکتری‌ها توسط اینولین می‌باشد که موجب بهبود توسعه اسیدیتة می‌گردد. اسیدیتة بالای محصولات پروبیوتیک می‌تواند نقش محافظت‌کنندگی در برابر توسعه و پیشرفت میکروارگانیسم‌های عامل فساد غذایی و توسعه دوره ماندگاری آن‌ها داشته باشد (Khezri et al., 2018). در همین راستا

کیفیت و پایداری محصول بررسی کنیم. زمانی ویسکوزیته افزایش یابد، پایداری محصول از طریق حفظ ترکیبات نامحلول در سوسپانسیون حفظ شده و یکنواختی محلول‌ها حفظ می‌گردد (Rossman, 2009). نتایج حاصل از بررسی ویسکوزیته نمونه‌های مختلف نوشیدنی آب پرتقال-هویج سین‌بیوتیک نشان داد که مقادیر ویسکوزیته تیمارهای مختلف نوشیدنی در محدوده CP ۶۷/۲۸-۶۷/۷ قرار داشت (جدول ۶).

به‌طور معنی‌داری بالاتر از شاهد و نوشیدنی پروبیوتیک بود (Khezri et al., 2018).

ویسکوزیته

آنالیز ویسکوزیته، یک روش ساده ولی سریع است که برای ارزیابی تمامیت سرعت مخلوط کردن اجزای فرمولاسیون به کار می‌رود. ارزیابی میزان ویسکوزیته به ما این قابلیت را می‌دهد تا تأثیر میزان سطح مواد جامد، درجه امولسیون‌کنندگی و هیدرولیز را بر

جدول ۶- مقایسه مقادیر ویسکوزیته (cp) تیمارهای مختلف نوشیدنی سین‌بیوتیک بر پایه آب پرتقال-هویج طی دوره نگهداری
Table 6- Comparison of the viscosity values (cp) of different symbiotic beverage treatments based on orange-carrot juice during storage period

زمان نگهداری (روز) Storage time (Day)				
30	20	10	1	
7.67± 1.15 B,g	8.33± 1.53 B,g	11.00± 1.00 A,g	11.33± 0.58 A,g	Ctrl
10.67± 0.58 B,f	12.00± 1.00 AB,f	12.33± 0.58 A,g	12.33± 0.58 A,g	T1
12.33± 0.58 B,e	14.33± 0.58 A,e	14.67± 0.58 A,f	14.67± 0.58 A,f	T2
14.33± 0.58 C,d	15.67± 0.58 B,d	17.00± 1.00 AB,de	17.33± 0.58 A,e	T3
18.67± 0.58 A,c	19.00± 1.00 A,c	19.33± 0.58 A,c	19.33± 0.58 A,d	T4
23.67± 0.58 A,ab	24.00± 1.00 A,ab	25.33± 0.58 A,b	25.67± 0.58 A,b	T5
24.33± 0.58 B,a	24.67± 0.58 B,a	28.67± 1.15 A,a	28.67± 0.58 A,a	T6
15.33± 0.58 B,d	15.67± 0.58 AB,d	16.33± 0.58 AB,e	16.67± 0.58 A,e	T7
18.33± 0.58 A,c	18.67± 0.58 A,c	19.00± 1.00 A,cd	19.33± 0.58 A,d	T8
22.67± 0.58 A,b	22.67± 0.58 A,b	23.67± 1.15 A,b	23.33± 0.58 A,c	T9
24.33± 0.58 A,a	24.67± 0.58 A,a	25.33± 0.58 A,b	25.33± 0.58 A,b	T10

*حروف لاتین بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر هر ردیف در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد (مقایسه تغییرات هر تیمار طی زمان).

*حروف لاتین کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد (مقایسه تیمارها در هر زمان ثابت).

Zokti James و همکاران (۲۰۱۶) مشاهده کردند که در نوشیدنی انبه حاوی عصاره چای سبز آزاد و انکپسوله شده با مواد پوشش‌دهی مختلف، بیشترین میزان ویسکوزیته در روز اول مربوط به نوشیدنی‌های حاوی بالاترین سطح میکروکپسول‌های حاوی چای سبز تهیه شده با صمغ عربی بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (Zokti et al., 2016). در برخی تیمارها در ابتدای دوره نگهداری تغییرات افزایشی و یا کاهشی در میزان ویسکوزیته مشاهده شد و سپس تقریباً ویسکوزیته تغییر قابل توجهی نداشت، در حالی که در برخی دیگر از تیمارها، میزان ویسکوزیته طی زمان به تدریج کاهش یافت. تأثیر افزایشی در ویسکوزیته محصولات غذایی مایع را اثر افزودن اینولین، توسط سایر محققین نشان داده شده است (Gibson et al., 1995). Sardarifar و همکاران (۲۰۱۸)، افزایش ویسکوزیته آب سیب در حضور هیدروکلوئیدهای پکتین و صمغ عربی را گزارش کردند. این محققان بیان کردند که به دلیل وزن مولکولی بالاتر صمغ عربی نسبت به پکتین، نوشیدنی‌های حاوی کپسول‌های تهیه شده با

کمترین میزان ویسکوزیته در کلیه بازه‌های زمانی مورد مطالعه در این تحقیق مربوط به شاهد بود و افزایش غلظت فرم آزاد و میکرو و نانوکپسول‌های عصاره در نوشیدنی‌ها منجر به افزایش معنی‌دار میزان ویسکوزیته گردید ($p < 0.05$). به‌طور کلی بیشترین ویسکوزیته در نوشیدنی حاوی ۱ درصد میکروکپسول تهیه شده با صمغ عربی به دست آمد. افزودن هر ترکیبی، مخصوصاً ترکیبات با وزن مولکولی بالا نظیر هیدروکلوئیدها، می‌تواند بر ویسکوزیته آب‌میوه مؤثر باشد. هیدروکلوئیدها قدرت جذب آب بالایی دارند و بنابراین با اتصال به مولکول‌های آب و تشکیل شبکه ژلی می‌توانند باعث افزایش ویسکوزیته شوند (Hosseinnia et al., 2017). به دلیل وزن مولکولی بالاتر صمغ عربی نسبت به مالتودکسترین و همچنین قابلیت جذب آب بالاتر آن، کپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی ویسکوزیته بالاتری نسبت به کپسول‌های حاوی مالتودکسترین ایجاد کردند. همچنین مشخص شد طی دوره نگهداری به تدریج میزان ویسکوزیته نوشیدنی‌ها کاهش یافت.

صمغ عربی ویسکوزیته بالاتری نشان دادند (Sardarifar et al., 2018).

عدد فرمالین

عدد فرمالین بیانگر مقادیر اسیدهای آمینه و پروتئین ها در نوشیدنی ها می باشد. این آزمون از این جهت دارای اهمیت است که اگر مقدار اسیدهای آمینه در آب میوه بالا باشد، با قند میوه ترکیب شده

و وارد واکنش مایلارد می شوند، در نتیجه رنگ آب میوه تیره خواهد شد. از آنجایی که مقدار فرمالین مجاز از نظر سازمان جهانی بهداشت برای آب میوه جات تا $22/4 \text{ mg/kg}$ می باشد (Khakbaz Heshmati & Khoshghadam, 2017) و مقادیر فرمالین به دست آمده در پژوهش حاضر در محدوده $3/60 - 3/33$ است (جدول ۷)، بنابراین در نوشیدنی های میوه ای تولیدی در پژوهش حاضر، مشکل بالا بودن مقدار فرمالین وجود ندارد.

جدول ۷- مقایسه مقادیر عدد فرمالین تیمارهای مختلف نوشیدنی سین بیوتیک بر پایه آب پرتقال-هویج طی دوره نگهداری

Table 7- Comparison of the formalin number values of different symbiotic beverage treatments based on orange-carrot juice during storage period

زمان نگهداری (روز)				
Storage time (Day)				
30	20	10	1	
$3.33 \pm 0.06^{C,c}$	$3.43 \pm 0.06^{BC,c}$	$3.47 \pm 0.06^{AB,b}$	$3.50 \pm 0.00^{A,b}$	Ctrl
$3.53 \pm 0.06^{B,b}$	$3.53 \pm 0.06^{B,bc}$	$3.57 \pm 0.06^{AB,ab}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T1
$3.53 \pm 0.06^{B,b}$	$3.53 \pm 0.06^{B,bc}$	$3.57 \pm 0.06^{AB,ab}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T2
$3.57 \pm 0.06^{A,ab}$	$3.57 \pm 0.06^{A,ab}$	$3.57 \pm 0.06^{A,ab}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T3
$3.57 \pm 0.06^{A,ab}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T4
$3.57 \pm 0.06^{A,ab}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T5
$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T6
$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T7
$3.57 \pm 0.06^{A,ab}$	$3.57 \pm 0.06^{A,ab}$	$3.57 \pm 0.06^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T8
$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T9
$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	$3.60 \pm 0.00^{A,a}$	T10

*حروف لاتین بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر هر ردیف در سطح احتمال ۵٪ می باشد (مقایسه تغییرات هر تیمار طی زمان).

*حروف لاتین کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می باشد (مقایسه تیمارها در هر زمان ثابت).

فرمالین ایجاد نکرد. این محققین همچنین بیان کردند که طی دوره نگهداری، عدد فرمالین نوشیدنی ها در ابتدا کاهش یافت و سپس به حالت اولیه خود برگشت (Hosseini et al., 2016). زمانی که باکتری ها از قندها به عنوان منبع انرژی استفاده می کنند، عدد فرمالین کاهش می یابد و با کاهش مصرف قندها و مصرف بالاتر اسیدهای آمینه، عدد فرمالین افزایش نشان می دهد. Khakbaz Heshmati و Khoshghadam (۲۰۱۷) نیز بیان کردند که غنی سازی نوشیدنی ترکیبی آلبالو و انگور قرمز با فیبر رژیمی اینولین به عنوان محصولی پری بیوتیک، اثر قابل توجهی بر میزان عدد فرمالین نوشیدنی های تولیدی نداشت (Khakbaz Heshmati & Khoshghadam, 2017).

کدورت

نتایج حاصل از بررسی کدورت نوشیدنی های سین بیوتیک بر پایه آب پرتقال-هویج حاوی فرم های مختلف عصاره ریشه بابا آدم نشان داد (جدول ۸) که کمترین میزان کدورت مربوط به نمونه شاهد بود و

به طور کلی، کمترین میزان عدد فرمالین مربوط به نمونه شاهد بود و افزودن فرم های مختلف عصاره ریشه بابا آدم به نوشیدنی های سین بیوتیک تولیدی موجب افزایش معنی دار عدد فرمالین نسبت به شاهد گردید ($p < 0.05$). در روزهای دهم و بیستم، نمونه های حاوی فرم آزاد عصاره ریشه بابا آدم عدد فرمالین کمتری نسبت به نمونه های حاوی میکرو و نانوکپسول ها داشتند. در تیمارهای نوشیدنی حاوی میکرو و نانوکپسول های عصاره طی دوره نگهداری تغییر قابل توجهی در عدد فرمالین مشاهده نشد، ولی در نمونه شاهد از روز اول تا روز آخر انبارمانی عدد فرمالین به تدریج کاهش یافت (جدول ۷). در تحقیقاتی مشابه Hosseini و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی تأثیر باکتری های پروبیوتیک و اینولین بر ویژگی های کیفی آب میوه های آلبالو و سیب صنعتی نشان دادند که نوع باکتری پروبیوتیک مورد بررسی بر عدد فرمالین نوشیدنی ها تأثیر دارد. به طوری که در نوشیدنی های حاوی لاکتوباسیلوس / سیدوفیلوس با افزایش اینولین، عدد فرمالین نیز افزایش یافت، ولی در نوشیدنی های حاوی لاکتوباسیلوس کارژی، افزایش سطح اینولین تغییر چندانی در عدد

بخشی از ذرات موجود در نوشیدنی‌ها طی دوره انبارمانی می‌باشد. در تحقیقاتی مشابه Pereira و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش کدورت در نوشیدنی‌های آب سیب پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی طی دوره نگهداری در یخچال را گزارش کردند (Pereira et al., 2011). همچنین Khakbaz Heshmati و Khoshghadam (۲۰۱۷) در بررسی تأثیر غنی‌سازی با اینولین بر خواص کیفی نوشیدنی ترکیبی آب آلبالو و انگور قرمز مشاهده کردند که افزودن اینولین به نوشیدنی موجب افزایش کدورت گردید، که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (Khakbaz Heshmati & Khoshghadam, 2017). این نتایج با مشاهدات Santos و همکاران (۲۰۱۹) نیز مطابقت دارد بطوریکه این محققان نشان دادند که در آب نیشکر غنی‌سازی شده با لاکتوباسیلوس کازئی و پری‌بیوتیک‌ها، طی دوره نگهداری ۲۸ روزه در ابتدا کدورت به طور معنی‌داری کاهش یافت و سپس مجدداً افزایش پیدا کرد (Santos et al., 2019). Arilla و همکاران (۲۰۲۰) نیز مشاهده کردند که افزودن مالتودکسترین به آب پرتقال موجب افزایش کدورت نوشیدنی‌های تولیدی گردید (Arilla et al., 2020).

افزایش غلظت فرم آزاد و میکرو و نانوکپسول‌های عصاره در نوشیدنی‌ها منجر به افزایش معنی‌دار میزان کدورت گردید ($p < 0.05$). بیشترین کدورت در نوشیدنی حاوی ۱ درصد میکروکپسول تهیه شده با صمغ عربی به‌دست آمد. در کلیه تیمارها از روز اول تا روز سی‌ام انبارمانی، میزان کدورت افزایش یافت به‌طوری‌که در پایان دوره نگهداری بیشترین میزان کدورت مربوط به نوشیدنی‌های حاوی ۱ درصد میکروکپسول صمغ عربی بود ($1/571$ NTU) و نوشیدنی حاوی ۱ درصد نانوکپسول صمغ عربی ($1/560$ NTU) پس از آن قرار داشت که نسبت به نمونه شاهد ($1/354$ NTU) این اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$). کدورت، غلظت ذرات پراکنده شده در یک محلول را توسط اندازه‌گیری خصوصیات به‌دام‌اندازی نوری آن، نشان می‌دهد (Vaillant et al., 2008). از این‌رو، استفاده از عصاره ریشه بابا آدم و صمغ عربی و مالتودکسترین به‌عنوان عوامل پوشش‌دهی کپسول‌ها توانست با افزایش غلظت ذرات پراکنده در نوشیدنی، کدورت را افزایش دهد. افزایش کدورت طی زمان نیز احتمالاً به دلیل رسوب

جدول ۸- مقایسه مقادیر کدورت (NTU) تیمارهای مختلف نوشیدنی سین‌بیوتیک بر پایه آب پرتقال-هویج طی دوره نگهداری
Table 8- Comparison of the turbidity values (NTU) of different symbiotic beverage treatments based on orange-carrot juice during storage period

زمان نگهداری (روز)				
Storage time (Day)				
30	20	10	1	
1.35±0.00 ^{A,j}	1.28±0.01 ^{B,g}	1.22±0.01 ^{C,g}	1.14±0.01 ^{D,h}	Ctrl
1.37±0.00 ^{A,i}	1.29±0.01 ^{B,g}	1.24±0.01 ^{C,g}	1.16±0.01 ^{D,g}	T1
1.42±0.00 ^{A,h}	1.33±0.00 ^{B,f}	1.27±0.01 ^{C,f}	1.95±0.00 ^{D,f}	T2
1.46±0.00 ^{A,f}	1.34±0.00 ^{B,de}	1.31±0.00 ^{C,e}	1.26±0.01 ^{D,cd}	T3
1.55±0.01 ^{A,c}	1.46±0.00 ^{B,b}	1.40±0.00 ^{C,b}	1.31±0.00 ^{D,b}	T4
1.47±0.00 ^{A,e}	1.37±0.00 ^{B,d}	1.33±0.00 ^{C,d}	1.27±0.01 ^{D,c}	T5
1.57±0.01 ^{A,a}	1.48±0.01 ^{B,a}	1.42±0.00 ^{C,a}	1.32±0.00 ^{D,a}	T6
1.45±0.00 ^{A,g}	1.36±0.00 ^{B,e}	1.31±0.01 ^{C,e}	1.23±0.00 ^{D,e}	T7
1.51±0.00 ^{A,d}	1.42±0.00 ^{B,c}	1.37±0.01 ^{C,c}	1.26±0.01 ^{D,cd}	T8
1.47±0.00 ^{A,e}	1.36±0.00 ^{B,e}	1.31±0.00 ^{C,e}	1.25±0.01 ^{D,d}	T9
1.56±0.00 ^{A,b}	1.47±0.00 ^{B,b}	1.40±0.00 ^{C,b}	1.32±0.01 ^{D,a}	T10

*حروف لاتین بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر هر ردیف در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد (مقایسه تغییرات هر تیمار طی زمان).

*حروف لاتین کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد (مقایسه تیمارها در هر زمان ثابت).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارهای مختلف نوشیدنی سین‌بیوتیک آب پرتقال-هویج به صورت IC50 اندازه‌گیری شد و نتایج آن نشان داد که طی دوره نگهداری ۳۰ روزه در دمای یخچال، به دلیل کاهش محتوای ترکیبات فنولی، مقادیر IC50 تیمارهای مختلف نوشیدنی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که به معنی کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (جدول ۹). همانطوری که انتظار می‌رفت،

بیشترین میزان IC50 و کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه شاهد مشاهده شد و افزایش سطوح فرم آزاد و میکرو و نانوکپسول‌های عصاره در نوشیدنی‌ها، به دلیل افزایش غلظت ترکیبات زیست‌فعال به‌ویژه پلی‌فنول‌ها، موجب کاهش معنی‌دار مقادیر IC50 و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید ($p < 0.05$). به‌طور کلی بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نوشیدنی حاوی ۱ درصد نانوکپسول تهیه شده با صمغ عربی به‌دست آمد، که به بالاتر بودن محتوای فنول کل

این تیمار برمی گردد. همچنین طبق نتایج، در تیمارهای حاوی نان و میکروکپسول های عصاره ریشه بابا آدم، افزایش IC50 (افت ترکیبات فنولی) طی زمان کمتر از تیمارهای حاوی فرم آزاد عصاره و نمونه کنترل بود، که این موضوع به نقش محافظت کنندگی کپسول ها و رهایش تدریجی ترکیبات فنولی از کپسول ها به داخل نوشیدنی و اکسایش دیرتر آن ها برمی گردد.

جدول ۹- مقایسه مقادیر IC50 (mg/ml) تیمارهای مختلف نوشیدنی سین بیوتیک بر پایه آب پرتقال-هویج طی دوره نگهداری
Table 9- Comparison of the IC50 values (mg/ml) of different symbiotic beverage treatments based on orange-carrot juice during storage period

زمان نگهداری (روز)				
Storage time (Day)				
30	20	10	1	
30.78± 0.41 ^{A,a}	23.91± 0.15 ^{B,a}	20.53± 0.34 ^{C,a}	14.11± 0.02 ^{D,a}	Ctrl
21.95± 0.09 ^{A,b}	16.11± 0.01 ^{B,c}	13.99± 0.16 ^{C,c}	10.26± 0.05 ^{D,e}	T1
10.55± 0.01 ^{A,f}	8.63± 0.06 ^{B,g}	7.51± 0.01 ^{C,g}	5.40± 0.01 ^{D,j}	T2
18.75± 0.16 ^{A,c}	16.45± 0.27 ^{B,b}	15.01± 0.07 ^{C,b}	14.01± 0.06 ^{D,b}	T3
9.20± 0.11 ^{A,g}	8.29± 0.05 ^{B,h}	7.51± 0.18 ^{C,g}	7.38± 0.04 ^{C,g}	T4
15.07± 0.51 ^{A,d}	14.36± 0.01 ^{B,d}	12.88± 0.12 ^{C,d}	12.37± 0.09 ^{D,c}	T5
7.89± 0.49 ^{A,h}	7.30± 0.14 ^{A,i}	6.60± 0.01 ^{B,h}	6.27± 0.00 ^{C,h}	T6
15.43± 0.49 ^{A,d}	13.55± 0.30 ^{B,e}	12.23± 0.10 ^{C,e}	11.48± 0.01 ^{D,d}	T7
7.91± 0.20 ^{A,h}	7.10± 0.05 ^{B,j}	6.43± 0.07 ^{C,i}	6.03± 0.07 ^{D,i}	T8
13.36± 0.12 ^{A,e}	12.51± 0.02 ^{B,f}	11.30± 0.16 ^{C,f}	10.12± 0.01 ^{D,f}	T9
6.67± 0.39 ^{A,i}	6.38± 0.08 ^{A,k}	5.83± 0.01 ^{B,j}	5.42± 0.03 ^{C,j}	T10

*حروف لاتین بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر هر ردیف در سطح احتمال ۵٪ می باشد (مقایسه تغییرات هر تیمار طی زمان).

*حروف لاتین کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می باشد (مقایسه تیمارها در هر زمان ثابت).

بالا تر از نو شیدنی غیر پروبیوتیک بود. همچنین در طی زمان نگهداری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت، در این تحقیق، رابطه مثبتی بین محتوای ترکیبات پلی فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی نو شیدنی آب سیب مشاهده گردید که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (Pereira et al., 2011). بر طبق تحقیقات صورت گرفته بر روی آب انار توسط Mousavi و همکاران (۲۰۱۳)، تخمیر اسید لاکتیک به طور معنی داری موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آب میوه گردید، به طوری که فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH آب انار شاهد ۵۷ درصد بود و در نوشیدنی های تخمیر شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به ترتیب به ۷۲ درصد و ۸۹ درصد افزایش یافت (Mousavi et al., 2013).

ویژگی های حسی

ویژگی های ارگانولپتیکی یا حسی، به عنوان یکی از مشخصات مهم محصولات پروبیوتیک مورد توجه بوده و برای پذیرش مصرف کننده در اولویت قرار دارند (Daneshi et al., 2013). در این تحقیق، ویژگی های حسی (رنگ، طعم و مزه، بو و پذیرش کلی) نوشیدنی های سین بیوتیک بر پایه آب پرتقال - هویج حاوی فرم های مختلف عصاره ریشه بابا آدم طی دوره نگهداری ۳۰ روزه در دمای یخچال بر طبق آزمون ۹ نقطه ای هدونیک مورد بررسی قرار گرفت

از آنجایی که آب پرتقال و آب هویج حاوی ترکیبات زیست فعال نظیر پلی فنول ها و کاروتنوئیدها هستند، فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می دهند (Raiesi et al., 2013). همچنین عصاره ریشه بابا آدم نیز حاوی ترکیبات فنولی مختلف نظیر اسیدهای کافئیک، کلروژنیک، ایزوکلروژنیک و مشتقات دی کافیل کوئینیک و غیره می باشد (Ghedira & Goetz, 2013). از این رو، فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه نوشیدنی های بر پایه آب پرتقال - هویج حاوی عصاره ریشه بابا آدم دور از انتظار نبود. در همین راستا Khezri و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که در نوشیدنی های آب انجیر سین بیوتیک حاوی اینولین، مقادیر ترکیبات فنولی طی دوره تخمیر بالاتر از نوشیدنی های پروبیوتیک بوده و از این رو، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد بالاتری داشته اند (Khezri et al., 2018). در این نوشیدنی ها مطابق با نتایج پژوهش حاضر طی دوره نگهداری محتوای فنول کل کاهش و فعالیت آنتی اکسیدانی نیز کاهش یافت، ولی فعالیت آنتی اکسیدانی در نوشیدنی حاوی اینولین طی کلیه زمان های مورد مطالعه بالاتر از نوشیدنی پروبیوتیک فاقد اینولین بود. محققین همچنین اظهار داشتند که باکتری های پروبیوتیک فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهند. Pereira و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که در نوشیدنی های آب سیب حاوی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به طور معنی داری

۶) بود که البته از نظر آماری با نمونه شاهد در یک سطح بودند ($p > 0.05$). دلیل کاهش امتیاز رنگ و در نتیجه پذیرش کلی تیمارهای تولید شده با صمغ عربی احتمالاً رنگ تیره پودر آن است، در حالی که مالتودکسترین یک پودر سفید است که با هیدرولیز جزئی نشاسته گیاهی به دست می‌آید و تأثیر منفی بر رنگ نوشیدنی‌ها ندارد.

در مطالعاتی مشابه Khezri و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی غنی‌سازی آب انجیر با اینولین و لاکتوباسیلوس دلیروکی گزارش کردند که افزودن پری‌بیوتیک اینولین به نوشیدنی پروبیوتیک، تأثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های حسی نوشیدنی آب انجیر شامل رنگ، بو، مزه و پذیرش کلی نداشت (Khezri et al., 2018). White و Hekmat (۲۰۱۸) نیز مشاهده کردند که افزودن اینولین به آب میوه‌های پروبیوتیک سیب، پرتقال و انگور اثر معنی‌داری بر پذیرش حسی نوشیدنی‌های تولیدی نداشت (White & Hekmat, 2018). در حالیکه Daneshi و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی ویژگی‌های حسی نوشیدنی مخلوط شیر- آب هویج پروبیوتیک، کاهش امتیازات حسی نوشیدنی‌ها طی دوره نگهداری را گزارش کردند (Daneshi et al., 2013).

که نتایج آن به صورت پذیرش کلی در جدول ۱۰ آورده شده است. طبق نتایج به دست آمده مشاهده شد که افزودن فرم‌های مختلف عصاره به فرمولاسیون نوشیدنی، تأثیر نامطلوبی بر طعم و بوی نمونه‌های تولیدی نداشت. همچنین افزودن عصاره آزاد و میکرو و نانوکپسول‌های تهیه شده با مالتودکسترین تأثیر نامطلوبی بر رنگ و پذیرش کلی نوشیدنی‌ها نداشتند، ولی با افزودن میکرو و نانوکپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی، امتیاز رنگ و پذیرش کلی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$). در اکثر تیمارها طی دوره نگهداری، به تدریج ویژگی‌های حسی کاهش پیدا کردند با این حال، کلیه تیمارها در تمامی روزهای مورد مطالعه در این تحقیق، امتیاز متوسط به بالا ($> 4/5$) کسب کرده و قابل پذیرش بودند، ولی همانطور که مشاهده می‌شود بالاترین پذیرش حسی در روز آخر انبارمانی مربوط به نوشیدنی‌های حاوی فرم‌های میکرو و نانوکپسول تهیه شده با مالتودکسترین بود (امتیاز ۸/۳ - ۸). نمونه‌های حاوی عصاره آزاد (امتیاز ۷/۷ - ۷/۵) نیز دارای پذیرش کلی بالاتری نسبت به شاهد (امتیاز ۷) بودند، این در حالی بود که کمترین امتیاز پذیرش کلی در بین همه نمونه‌های تولید شده متعلق به تیمارهای حاوی ۰/۵ و ۱ در صد میکرو و نانوکپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی (امتیاز ۶/۷ -

جدول ۱۰- مقایسه امتیازات پذیرش کلی تیمارهای مختلف نوشیدنی سین‌بیوتیک بر پایه آب پرتقال-هویج طی دوره نگهداری
Table 10- Comparison of the overall acceptance scores of different symbiotic beverage treatments based on orange-carrot juice during storage period

زمان نگهداری (روز)				
Storage time (Day)				
30	20	10	1	
7.00± 0.00 ⁱ	7.70± 0.11 ^g	8.20± 0.23 ^{def}	8.80± 0.21 ^{ab}	Ctrl
7.50± 0.09 ^{gh}	8.10± 0.19 ^{ef}	8.30± 0.19 ^{cde}	8.60± 0.25 ^{abcd}	T1
7.70± 0.21 ^g	8.10± 0.25 ^{ef}	8.20± 0.12 ^{de}	8.40± 0.22 ^{bcde}	T2
8.00± 0.21 ^f	8.30± 0.07 ^{cde}	8.70± 0.14 ^{abc}	8.90± 0.16 ^a	T3
8.30± 0.14 ^{cde}	8.30± 0.05 ^{cde}	8.70± 0.21 ^{abc}	8.80± 0.18 ^{ab}	T4
7.00± 0.16 ⁱ	6.90± 0.16 ⁱ	7.00± 0.05 ⁱ	7.00± 0.08 ⁱ	T5
6.80± 0.11 ⁱ	6.90± 0.21 ⁱ	6.90± 0.12 ⁱ	7.00± 0.10 ⁱ	T6
8.10± 0.18 ^{ef}	8.40± 0.12 ^{bcde}	8.80± 0.08 ^{ab}	9.80± 0.15 ^a	T7
8.20± 0.10 ^{def}	8.50± 0.09 ^{bcde}	8.80± 0.06 ^{ab}	8.80± 0.15 ^{ab}	T8
6.90± 0.08 ⁱ	6.90± 0.16 ⁱ	7.00± 0.22 ⁱ	7.10± 0.11 ^{hi}	T9
6.90± 0.15 ⁱ	6.80± 0.21 ⁱ	6.80± 0.16 ⁱ	7.00± 0.09 ⁱ	T10

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، ابتدا ریزپوشانی عصاره ریشه بابا آدم با دو روش خشک کردن پاششی (میکروکپسولاسیون) و خشک کردن انجمادی (نانوکپسولاسیون) و استفاده از مالتودکسترین و صمغ عربی به عنوان عوامل پوشش‌دهنده دیواره کپسول انجام شد. سپس تأثیر عصاره‌های کپسوله شده به اشکال مختلف (آزاد/ میکرو/ نانو) بر خواص آنتی‌اکسیدانی و حسی نوشیدنی پرتقال- هویج حاوی باکتری

لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز و شناسایی ترکیبات کربوهیدراتی عصاره نشان داد محتوای کل پلی‌فروکتوزهای عصاره برابر $12/9 \pm 0/88$ g/100g DW اندازه‌گیری شد که حدود ۷۵ درصد آن $9/75 \pm 0/65$ g/100g DW شامل اینولین می‌باشد. فروکتوالیگوساکاریدهای Nystose و 1-Kestose که ترکیبات تجزیه شده حاصل از فروکتان‌ها هستند نیز به ترتیب به میزان $0/88 \pm 0/18$ و $0/53 \pm 0/08$ g/100g DW شناسایی شدند. نتایج

کپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی موجب تیره‌تر شدن رنگ نوشیدنی‌های تولیدی و در نتیجه کاهش پذیرش کلی گردید. با این وجود، کلیه تیمارهای نوشیدنی در تمامی روزهای مورد مطالعه از لحاظ ویژگی‌های حسی امتیاز قابل قبولی کسب کرده و قابل پذیرش بودند. همچنین در کلیه تیمارهای نوشیدنی سین‌بیوتیک تولیدی در این تحقیق، تا روز آخر انبارمانی در دمای یخچال، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در حد استاندارد تعیین شده برای محصولات پروبیوتیک بود. بنابراین با توجه به نتایج ارزیابی دستگاهی و حسی، نانوکپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی (T10) به‌عنوان تیمار مطلوب انتخاب شده و تولید و استفاده آن برای پایداری ترکیبات حساس عصاره‌های گیاهی به‌منظور افزایش خواص سلامتی بخش توصیه می‌شود.

مرحله ریز پوشانی نشان داد بالاترین بازده کپسولاسیون و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نانوکپسول‌های تهیه شده با صمغ عربی به‌دست آمد. تصاویر SEM نیز نشان داد کپسول‌های تولیدی از لحاظ ریزساختار، اکثراً دارای گوشه و صفحه‌ای مانند بودند و شکل منظمی نداشتند. نتایج مرحله غنی‌سازی آبمیوه پرتقال- هویج هم نشان داد با افزودن فرم‌های مختلف عصاره ریشه بابا آدم، عدد فرمالین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قابلیت زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، کدورت و ویسکوزیته نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. به‌طور کلی، عصاره‌های کپسوله شده تأثیر بالاتری نسبت به فرم آزاد عصاره بر حفظ کیفیت و خواص عملگرایی نوشیدنی‌های سین‌بیوتیک تولیدی داشتند، به‌طوری که تأثیر نانوکپسول‌های عصاره تهیه شده با صمغ عربی بر افزایش قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها و افزایش محتوای فنول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی بالاتر از سایر فرم‌های عصاره بود. با این حال، افزودن

منابع

1. Akdeniz, B., Sumnu, G. & Sahin, S. (2017). The Effects of Maltodextrin and Gum Arabic on Encapsulation of Onion Skin Phenolic Compounds. *Chemical Engineering Transactions*, 57: 1891-1896.
2. Akhavan Mahdavi, S., Jafari, S.M., Assadpoor, E. & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85: 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>
3. Arilla, E., Igual, M., Martínez-Monzó, J., Codoñer-Franch, P. & García-Segovia, P. (2020). Impact of Resistant Maltodextrin Addition on the Physico-Chemical Properties in Pasteurised Orange Juice. *Foods*, 9(12): 1832-1843. <https://doi.org/10.3390/foods9121832>
4. Badfarsa, H. & Ahmadzadeh Ghavidel, R. (2017). The effect of encapsulation process using frozen dryer on the physicochemical and antioxidant properties of *Heracleum Persicum* essential oil. *Iranian Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 10(2): 123-136.
5. Bagaoutdinova, I., Fedoseyeva, P. & Okoneshnikova, F. (2001). Fructose-containing carbohydrates in plants of different families. Localization and content," *Chem. Comp. Sim. Butlerov Comm*, vol.2 pp. 13-16.
6. Ballesteros, L.F., Ramirez, M.J., Orrego, C.E., Teixeira, J.A. & Mussatto, S.I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237: 623-631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>
7. Bruno, R.G.S., Rutigliano, H.M., Cerri, R.L., Robinson, P.H. & Santos, J.E.P. (2009). Effect of feeding *Saccharomyces Cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. *Animal Feed Science and Technology*, 150: 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.09.001>
8. Burin, V.M., Rossa, P.N., Ferreira-Lima, N.E., Hillmann, M.C.R. & Boirdignon-Luiz, M.T. (2011). Anthocyanins: optimisation of extraction from *Cabernet Sauvignon* grapes, microencapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(1): 186-193.
9. Cao, T.L., Yang, S.Y. & Song, K.B. (2018). Development of burdock root inulin/chitosan blend films containing oregano and thyme essential oils," *Int. J. Mol. Sci*, 19 (1): 131-143. <https://doi.org/10.3390/ijms19010131>
10. Cheraghali, F., mirmoghtadaie, L., Shojaee-aliabadi, S. & Hosseini, S.M. (2016). A Comparative Study of Antimicrobial and Antioxidant Properties of Walnut Green Husk Aqueous Extract before and after Microencapsulation. *Iranian Journal of Nutrition Science and Food Technology*, 11(2): 113-124.
11. Daneshi, M., Ehsani, M.R., Razavi, S.H. & Labbafi, M. (2013). Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5): 1-12.
12. Esmaeili F., Hashemiravan M., Eshaghi M. R., Gandomi H. (2021). Optimization of aqueous extraction conditions of inulin from the *Arctium lappa L.* roots using ultrasonic irradiation frequency. *Journal of food quality*, <https://doi.org/10.1155/2021/5520996>.
13. Fernandes, R.V., Borges, S.V., Botrel, D.A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydr. Polym.*, 101, 524-532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.083>

14. Ghedira, K. & Goetz, P. (2013). *Arctium lappa* L. (Asteraceae): Bardane. *Phytothérapie*, 11: 376-380. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0827-1>
15. Gibson, G.R., Beahy, E.R., Wang, X. & Cummings, J.H. (1995). Selective Stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *American Gastroent Assocition*, 108: 975-982. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90192-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90192-2)
16. Gilles, K.K., K.T. Vinod, L.M. Christopher, A. Tarab, S.B. Mark, M.G. Netkal and J.T. Ronald, (2012). Nano-microencapsulation and controlled release of linoleic acid in biopolymer matrices: Effects of the physical state, water activity and quercetin on oxidative stability. *J. Encapsulation Adsorption Sci*, 2, 1-10.
17. Haghshenas B, Nami Y, Abdullah N and Yari Khosroshahi A, (2015). Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota. *LWT - Food Science and Technology*, 60: 690–697. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.058>
18. Hosseini, M.Y., Rezazadbari, M. & Alizade, M. (2016). Production of synbiotic juice: study on the effect pH, Brix, Formalin index and Rheological. *FSCT*, 14(63): 73-81.
19. Hosseinnia, M., Alizadeh Khaledabad, M. & Almasi, H. (2017). Optimization of *Ziziphora clinopodiodes* essential oil microencapsulation by whey protein isolate and pectin: A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101: 958-966. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.190>
20. Huang, J. & Yang, L. (2011). Microencapsulation of anthocyanin from fruits of *Berberis kaschgarica* Rupr. *Food Science*, 32(16): 16-21.
21. ISIRI. (2007). Fruit juices– Test methods. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. NO. 2685. 1st.revision.
22. Jia, Z., Dumont, M.J. & Orsat, V. (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15: 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.007>
23. Junior, T., Kuhn, F., Padilha, P.J.M and Vicente, L.R.M. (2018). Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Biology*, 78 (2): 311-317. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.08716>
24. Khakbaz Heshmati, M. & Khoshghadam, H. (2017). The investigation of rheological and physicochemical characteristics of new formulation of juice produced by combination of sour cherry and red grape, fortified with inulin dietary fibre as a prebiotic product. *Journal of Food Research*, 27(4): 121-134.
25. Khezri, S., Mahmoudi, R. & Dehghan, P. (2018). Fig juice fortified with inulin and *Lactobacillus Delbrueckii*: a promising functional food. *Applied Food Biotechnology*, 5(2): 97-106.
26. Lacroix, C. & Yildirim, S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Currently Opinion Biotechnology*, 18(2): 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.002>
27. Le, T.H., Tran, T.M.V., Ton, N.M.N., Tran, T.T.T., Huynh, T.V., Nguyen, T.N., Quang, S.P. & Le, V.V.M. (2017). Combination of whey protein and carbohydrate for microencapsulation of pumpkin (*Cucurbita* spp.) seed oil by spray-drying. *International Food Research Journal*, 24(3): 1227-1232.
28. Lebekka, V.R., Wee, Y.J., Narala, V.R. & Joshi, V.K. (2018). Chapter 2: Development of New Probiotic Foods-A Case Study on Probiotic Juices. *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*. PP: 54-77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00004-2>
29. Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21: 928-935. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.011>
30. Mahmoud, K. F., Ibrahim, M. A., Mervat, E. D., Shaaban, H. A., Kamil, M. M. & Hegazy, N. A. (2016). Nano-encapsulation efficiency of lemon and orange peels extracts on cake shelf life. *American Journal of Food Technology*, 11(3): 63-75.
31. Milani, E., Koocheki, A., Golimovahhed, Q. A. (2011). Extraction of inulin from Burdock root (*Arctium lappa*) using high intensity ultrasound. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (8): 1699–1704.
32. Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Hadinejad, M., Emam-Djomeh, Z. & Mirzapour, M. (2013). Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. *Food Biotechnology*, 27(1): 1-13. <https://doi.org/10.1080/08905436.2012.724037>
33. Naga Sivudu, S., Ramesh, B., Umamahesh, K. & Vijaya Sarathi Reddy, O. (2016). Probiotication of Tomato and Carrot Juices for Shelf-life Enhancement using Micro-encapsulation. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 6(2): 13-22.
34. Papoutsis, K., Golding, J. B., Vuong, Q., Pristijono, P., Stathopoulos, C. E., Scarlett, C. J. & Bowyer, M. (2018). Encapsulation of citrus by-product extracts by spray-drying and freeze-drying using combinations of maltodextrin with soybean protein and α -Carrageenan. *Foods*, 7(7): 115-126. <https://doi.org/10.3390/foods7070115>

35. Pereira, A.L.F., Maciel, T.C. & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44(5): 1276-1283. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>
36. Petkova, N., Ivanov, I., Mihaylova, D., Lante, A. (2020). Effect of pressure liquid extraction and ultrasonic irradiation frequency on inulin, phenolic content and antioxidant activity in burdock (*Arctium lappa* L.) roots. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 19(3), 125–133.
37. Pimentel, T.C., Madrona, G.S., Garcia, S. & Prudencio, S.H. (2015). Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1): 415-422. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.009>
38. Rafigh, S., Sharma, V., Nazir, A., Rashid, R., Sa, S. & Ahmad Nayik, G. (2016). Development of probiotic carrot juice. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6(4): 534-540.
39. Raiesi, F., Hojjatoleslami, M., Razavi, S.H., Zahedi, M. & Memarzadeh, S.M. (2013). Investigation of rheological properties of enriched orange drink using rice bran extract. *FSCT*, 10(40): 117-128.
40. Rakmai, J., Cheirsilp, B., Cid, A., Torrado-Agrasar, A., Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (2018). Encapsulation of Essential Oils by Cyclodextrins: Characterization and Evaluation. *Cyclo: A Ver. Ing.*, pp 263.
41. Rossman, J.M. (2009). Commercial manufacture of edible films. In *Edible films and coatings for food applications* (pp. 367-390). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_14
42. Samsam Shariat, H. (2005). Collection of medicinal herbs. Esfahan: Mani Publications; p. 43.
43. Santos, M.A., Costa, G.M., Dias, S.S., Klososki, S.J., Barão, C.E., Gomes, R.G. & Pimentel, T.C. (2019). Pasteurised sugarcane juice supplemented with *Lactobacillus casei* and prebiotics: physicochemical stability, sensory acceptance and probiotic survival. *International Food Research Journal*, 26(4): 1315-1325.
44. Sardarifar, I., Almasi, H. & Roufegarinezhad, L. (2019). Microencapsulation of zinc micronutrient by spray drying method and its application in apple juice fortification. *Journal of Food Research*, 29(2): 47-63.
45. Sharifi, A., Niakousari, M., Maskooki, A. & Mortazavi, S.A. (2015). Effect of spray drying conditions on the physicochemical properties of barberry (*berberis vulgaris*) extract powder. *International Food Research Journal*, 22(9): 2364-2370.
46. Sheehan, V., Ross, P. & Fitzgerald, G.F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovation of Food Science, Emergency and Technology*, 8: 284-279. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.007>
47. Shoaib M., Shehzad A., Omar M., Rakha A., Raza H., Sharif H. R., Shakeel A., Ansari A. & Niazi S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers* 147; 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020>
48. Souri, A., Mirzaei, M. & Mirdamadi, S. (2019). The effect of green leaf tea extract on probiotic bacterial viability in watermelon juice. *JFST*, 85(15): 73-86.
49. Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci*; 108-109:303-18. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
50. Tewari S., Ramalakshmi K., Methre L., Rao L. J. M. 2015. Microwave-Assisted Extraction of Inulin from Chicory Roots Using Response Surface Methodology, *J Nutr Food Sci* 2015, 5 (1); 1-6.
51. Tonon, R.V., Brabet, C. & Hubinger, M.D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*euterpe oleraceae* mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3): 411-418. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>
52. Vaillant, F., Pérez, A.M., Acosta, O. & Dornier, M. (2008). Turbidity of pulpy fruit juice: A key factor for predicting cross-flow microfiltration performance. *Journal of Membrane Science*, 325: 404-412. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.08.003>
53. Wegerif M C. A., Hebinck P. 2016. The Symbiotic Food System: An ‘Alternative’ Agri-Food System Already Working at Scale. *Agriculture*, 6, (40); 1-25. <https://doi.org/10.3390/agriculture6030040>
54. White, J. & Hekmat, S. (2018). Development of probiotic fruit juices using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 fortified with short chain and long chain inulin fiber. *Fermentation*, 4: 27-38. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020027>
55. Wu King-Chuen., Weng Hung-Kai., Hsu Yun-Shang., Huang Pin-Jia., Wang Yang-Kao. (2020). Aqueous extract of *Arctium lappa* L. root (burdock) enhances chondrogenesis in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20; 364. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03158-1>
56. Yang, L., Yin, P., Hang, F., Xue, Q., Li, K., Li, X., Sun, L. & Liu, Y. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted extraction by response surface methodology with maximal phenolic yield and antioxidant activity from *Acer truncatum* leaves. *Peer-reviewed version available at Molecules*, 22: 232-251.
57. Yeo, S.K. & Liong, M.T. (2010). Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of Science Food and Agriculture*, 90(2): 267-275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3808>

58. Yoon, K.Y., Woodams, E.E. & Hang, Y.D. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1):73-5. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.008>
59. Zahrani, K., Imansari, F., Utami, T.S. & Arbianti, R. (2016). Release profile of *Andrographis paniculata* leaf extract Nano-capsule as α -Glucosidase inhibitors. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 214: 1-8. [DOI:10.1088/1757-899X/214/1/012020](https://doi.org/10.1088/1757-899X/214/1/012020)
60. Zokti James, A., Baharin, B.S., Abdulkarim S. M. & Abas, F. (2016). Microencapsulation of green tea extracts and its effects on the physicochemical and functional properties of mango drinks. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 16(02): 16-32.



The effect of glycerol and nanocellulose on hydrophilic and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose composites

Sanaz Golmohammadzadeh¹, Farid Amidi-Fazli*¹ 

Received: 2021.06.08

Revised: 2021.08.29

Accepted: 2021.11.22

Available Online: 2021.11.22

How to cite this article:

Amidi-Fazli, F., Golmohammadzadeh, S. (2022). The effect of glycerol and nanocellulose on hydrophilic and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose composites. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 681-697.

Abstract

Introduction: The biodegradability of synthetic plastics derived from petroleum is a very slow process and complete decomposition of them lasts several years. This increases environmental pollution. Extensive efforts have been made to develop and improve biopolymers-based packaging. Biopolymers derived from renewable agricultural resources are an appropriate alternative to synthetic plastics. The use of nanotechnology in the field of polymer science has led to the production of nanocomposite polymers. The valuable nanocomposites would be produced if natural nanoparticles are used in composites preparation. Because of the importance of nanocomposites in the production of biodegradable films and due to desired properties of gelatin and carboxymethyl cellulose in film production, this study aimed to investigate the effect of glycerol and nanocellulose on the properties of gelatin-carboxymethyl cellulose nanocomposites.

Materials and Methods: To prepare 12 different treatments based on statistical design, 1 g of gelatin and 1 g of carboxymethylcellulose were dissolved in distilled water to form a uniform solution. Then, glycerol as a plasticizer was added to the prepared solutions at different levels (20 to 60% w/w). The determined amount of nanocellulose (0- 30% w/w), based on the biopolymers weight, was added to the cooled blend at 70°C. Nanocellulose was extracted from cotton through the chemical method, cotton was gone under chemical hydrolysis by the sulfuric acid solution (65% w/v). The properties of gelatin-carboxymethylcellulose nanocomposites were studied. The produced nanocellulose evaluated by scanning electron microscopy and X-ray diffraction techniques. The thickness of the films was measured using a caliper with a precision of 0.01. At five different parts of each film. Water vapor flux and water vapor permeability through the film samples were determined. The dry matter of 20× 20 mm film samples before and after immersion in 50 ml of distilled water for 24h at 25 °C was determined to calculate the solubility in water of the films. To measure the moisture absorption of the nanocomposite samples, 20× 20 mm film pieces were kept in a container containing potassium sulfate saturated solution (RH= 97%) at 25°C for 4 days. Films were weighted initially and at the end of the experiment. Sessile drop method, a common technique for determining the wetting properties of solid surfaces, was then used to determine the contact angle. Ultimate tensile strength and elongation at break were measured. The belt-shaped sample (8× 1 cm) of the film was stretched by the instrument at a velocity of 1 mm/s. The color and transparency of the samples were evaluated in the black box by image processing technique. Total color difference (ΔE), yellow index (YI), and white index (WI) of the samples were calculated. Treatments were prepared according to central composite design (CCD) and were statically analyzed by response surface method (RSM).

Results and Discussion: The prepared films showed low water vapor permeability (3.62×10^{-11} to 2.23×10^{-12} gm/m²Pas). The lowest amount of water vapor permeability was obtained when the low level of nanocrystalline cellulose (4.4%) was used. The high amounts of glycerol and nanocellulose increased the solubility of the films and even in some

1. M.Sc. graduate of Food Science and Technology, Sofian Branch, Islamic Azad University, Sofian, Iran.

2. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Sofian Branch, Islamic Azad University, Sofian, Iran.

(*Corresponding Author Email: amidi_f@yahoo.com)

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70884.1057

treatments the samples were completely dissolved in water. The hydrophilic nature of the gelatin and carboxymethyl cellulose used in the preparation of composites may be the reason for the high solubility of the produced films. At the same time, the samples showed high moisture absorption. Moisture absorption decreased as a result of the glycerol content increased, also the effects of the presence of nanocrystalline cellulose as a filler on the moisture absorption decrease cannot be neglected. A moderate contact angle of about 60° was observed, the interactions between the polar and the hydroxyl groups of the biomaterials used in the production of composites caused different behaviors observed in the various treatments. The interaction of nanocellulose and glycerol had a significant effect on the contact angle. The films had high ultimate tensile strength (84.37 MPa) while the elongation at break was 4.14% for the same treatment, which indicates low flexibility of the produced films. The color of the samples was evaluated as suitable. The use of 60% glycerol and 4.4% nanocellulose results in the production of films with desirable properties. The use of gelatin and carboxymethylcellulose produced composites that had improved properties in the terms of water vapor permeability and surface wetting compared to pure films.

Composites made of gelatin and carboxymethylcellulose showed high ultimate tensile strength, although the elongation at break of them was not desirable. In terms of barrier properties against the water vapor, prepared composites demonstrated improved properties when compared to other bio-based made films. On the other hand, in terms of hydrophilicity, they are classified as moisture-sensitive films, which limits their use for foods with high moisture content. The use of carboxymethyl cellulose can improve the water vapor permeability of pure gelatin films. Also, the use of gelatin increases the contact angle of water of pure carboxymethyl cellulose films. Gelatin-carboxymethyl cellulose nanocomposite contains 60% glycerol and 4.4% nanocellulose presents improved and desirable properties.

Keywords: Gelatin, Carboxymethyl cellulose, Nanocellulose, Hydrophilicity, Mechanical properties.

مقاله علمی-پژوهشی

تاثیر گلیسرول و نانوسلولز بر ویژگی‌های آبدوستی و مکانیکی کامپوزیت‌های

ژلاتین- کربوکسی متیل سلولز

ساناز گل محمدزاده خیابان^۱ - فرید عمیدی فضلی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۱

چکیده

تلاش‌های گسترده‌ای جهت توسعه بسته‌بندی‌های بر پایه بیوپلیمرهای زیست تخریب‌پذیر و بهبود کارایی آنها صورت گرفته است. بیوپلیمرها که از منابع قابل تجدید کشاورزی حاصل می‌شوند جایگزینی مناسب برای پلاستیک‌های سنتزی به‌شمار می‌روند. اثر گلیسرول (۶۰٪-۲۰) به‌عنوان نرم‌کننده و نانوکریستال سلولز (۳۰٪-۰) به‌عنوان پرکن بر ویژگی‌های نانوکامپوزیت‌های ژلاتین- کربوکسی متیل سلولز مطالعه گردید. نانوسلولز مورد استفاده به روش هیدرولیز اسیدی تولید و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و پراش اشعه ایکس مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تولید نانوکامپوزیت‌ها به روش تیخیر حلال آزمون‌های نفوذپذیری نسبت به بخار آب، حلالیت در آب، جذب رطوبت، زاویه تماس، خواص رنگی و خواص مکانیکی انجام یافت. فیلم‌های تهیه شده زمانی که از نانوسلولز کمتری استفاده شد نفوذپذیری کمتری نسبت به بخار آب از خود نشان دادند (10^{-11} تا $2/23 \times 10^{-12}$ gm/m²Pas) ولی غلظت‌های بالای نانوکریستال سلولز موجب افزایش نفوذپذیری نسبت به بخار آب می‌شود. با افزایش میزان گلیسرول به دلیل تشکیل پیوندهای جدید و از دسترس خارج شدن گروه‌های هیدروکسیل از مقادیر جذب رطوبت کاسته می‌شود البته در مقادیر پایین نانوکریستال سلولز وارد فضاهای خالی در ماتریکس فیلم شده و از حرکت آزادانه ملکول‌های آب ممانعت به عمل می‌آورد. همین‌طور نمونه‌های تولید شده مقادیر جذب رطوبت بالا داشتند و زاویه تماس متوسطی در حدود ۶۰ درجه از خود نشان دادند. در سطوح ثابت نانوکریستال سلولز با افزایش مقدار گلیسرول زاویه تماس کاهش یافته است چرا که گلیسرول به‌عنوان یک ترکیب چند الکلی از خاصیت آبدوستی زیادی برخوردار است. اثر متقابل نانوسلولز و گلیسرول بر این ویژگی معنی‌دار است. در تیمارهای با سطوح پایین گلیسرول ازدیاد طول در نقطه شکست به زیر ۵ درصد تقلیل یافته است. در خصوص استحکام کششی فیلم‌های حاصل از قدرت بالایی برخوردار هستند و حداکثر استحکام کششی ۸۴/۳۷ مگاپاسکال به‌دست آمد این مقدار در مورد تیماری است که از ۴۰ درصد گلیسرول بدون افزودن نانوسلولز تهیه شده بود به‌دست آمد افزودن نانوسلولز به مقدار ۴ درصد باعث کاهش جزئی در استحکام کششی می‌شود. رنگ نمونه‌ها مطلوب ارزیابی گردید. استفاده از گلیسرول به میزان ۶۰ درصد و نانوسلولز به مقدار ۴/۴ درصد سبب تولید فیلم با ویژگی‌های مطلوب می‌شود. به کارگیری ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز باعث تولید فیلم‌هایی گردید که از نظر نفوذپذیری نسبت به بخار آب و نم شوندگی سطوح نسبت به فیلم‌های خالص دارای ویژگی‌های بهبود یافته‌ای هستند.

واژه‌های کلیدی: ژلاتین، کربوکسی متیل سلولز، نانوسلولز، خواص آبدوستی، خواص مکانیکی.

مقدمه

آنها چندین سال به طول می‌انجامد و این امر باعث افزایش آلودگی‌های زیست محیطی می‌گردد. لذا طی سال‌های اخیر، یافتن جایگزینی مناسب برای پلاستیک‌های سنتزی، به‌طوری که زیست تخریب‌پذیری بالایی داشته و آلودگی زیست محیطی کمتری بر جای بگذارد توجه محققین را به خود جلب کرده است.

از پلیمرهای سنتزی، پلاستیکی، کاغذ و فلزات برای بسته‌بندی‌های مواد غذایی به‌طور گسترده استفاده می‌شود که دلیل آن فراوانی، در دسترس بودن و قیمت کم این مواد است (Zahed Karkaj and Peighambardoust, 2018). زیست تخریب‌پذیری مواد پلاستیکی سنتزی حاصل از مشتقات نفتی فرایندی بسیار کند بوده و تجزیه کامل

* نویسنده مسئول: Email: amidi_f@yahoo.com

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70884.1057

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد صوفیان، دانشگاه آزاد اسلامی، صوفیان، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد صوفیان، دانشگاه آزاد اسلامی، صوفیان، ایران.

اسیدهای آمینه قطبی تشکیل می‌دهد. به همین دلیل پروتئین‌ها خصوصیات بازدارندگی خوبی در برابر اکسیژن و گازهای دیگری مانند دی‌اکسید کربن دارند. قطبیت پروتئین‌ها خصوصیات بازدارندگی فیلم‌های پروتئینی را تعیین می‌کند. فیلم‌های پروتئینی نفوذپذیری زیادی به مواد قطبی مانند بخار آب و نفوذپذیری کمی به مواد غیرقطبی مانند اکسیژن، آروما و روغن دارند. نفوذپذیری فیلم‌های پروتئینی به مواد قطبی و غیرقطبی در حضور نرم‌کننده‌ها و رطوبت نسبی زیاد افزایش می‌یابد. برای ایجاد خواص بازدارندگی مطلوب در فیلم پروتئینی باید نرم‌کننده‌ها و پروتئین مناسب را انتخاب نمود و شرایط تشکیل فیلم را بهینه کرد.

در بین پلیمرهای طبیعی، ژلاتین که از تجزیه حرارتی یا شیمیایی کولازن حاصل می‌شود، به علت سازگاری با محیط و قابلیت تجزیه پذیری و ارزان بودن مورد توجه بسیار قرار گرفته است. ژلاتین پروتئینی با رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای است و تقریباً بی بو و بدون مزه می‌باشد و در آب گرم، گلیسرول و اسیداستیک محلول و در حلال‌های آلی غیرمحلول می‌باشد. ژلاتین در دما حدود ۳۲ تا ۳۵ درجه حدود ۵ تا ۱۲ برابر وزن خود آب جذب می‌کند و به یک ژل آیکی تبدیل می‌شود. (Bower et al., 2006). فیلم‌های ژلاتینی نسبت به رطوبت حساس بوده و حلالیت بالایی در آب دارند. یکی از راه‌های رفع نقایص فیلم‌های پلیمری زیستی ایجاد ترکیب‌هایی از آنها با نانو ذرات است که موجب تحقیق و توسعه نانو کامپوزیت‌های زیستی شده است. از کاربردهای ژلاتین می‌توان به عنوان قوام‌دهنده، شفاف‌کننده و عامل پوشش‌دهنده در صنایع غذایی اشاره کرد (Asgar et al., 2010). کاربرد ژلاتین در زمینه توانایی تولید فیلم و همچنین قابلیت استفاده از آن بعنوان یک پوشش خارجی برای محافظت غذا از خشک شدن، نور و اکسیژن، مورد بررسی قرار گرفته است (Ayranci and Tunc, 2003). فیلم‌های ژلاتینی علیرغم برخورداری از ویژگی‌های ممانعتی خوب در برابر اکسیژن، فاقد خواص مکانیکی و ممانعتی مناسب در برابر رطوبت هستند که کاربردهای بالقوه‌شان را محدود می‌کند. ژلاتین ماهی سرد آبی فیلم‌های با خواص و ظاهر مناسب تشکیل می‌دهد، ولی مشکل اصلی آن آب دوستی نسبتاً بالا و پایین بودن خواص ممانعت کنندگی فیلم‌های حاصل از آن در برابر رطوبت در مقایسه با فیلم‌های سنتزی رایج می‌باشد که باعث محدود شدن استفاده از این بیوپلیمر در زمینه‌های مختلف می‌شود. در دهه‌های گذشته نیز علاقه روزافزونی در رابطه با کاربرد آن بعنوان ماده بسته‌بندی غذا به وجود آمده است (Gomez-Guillen et al., 2007). طی تحقیقی فیلم‌های پکتین-ژلاتین، پکتین-ژلاتین-گلوتارآلدئید و ژلاتین خالص تولید شد و این فیلم‌ها مقایسه گردیدند. در این بررسی مشخص شد که هیدروژل تولید شده که حاوی پکتین بود نسبت به ژلاتین خالص تورم کمتری داشت

بیوپلیمرهای خوراکی با زیست تخریب‌پذیری بالا که از منابع قابل تجدید کشاورزی حاصل می‌شوند، گزینه‌ای مناسب در این زمینه به شمار می‌روند. برای این منظور می‌توان از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و یا مخلوطی از آن‌ها استفاده کرد. پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مورد استفاده در تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر را می‌توان به دو دسته طبیعی (بیوپلیمرها) و سنتزی تقسیم‌بندی کرد. پلی‌ساکاریدها از جمله مهم‌ترین بیوپلیمرهای مورد استفاده در تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر می‌باشند (Abolghasemi et al., 2012).

استفاده از فناوری نانو در زمینه علم پلیمر به تولید پلیمرهای نانو کامپوزیت منجر شده است. نانو کامپوزیت‌ها پلیمرهایی هستند که در آن‌ها از نانوذرات آلی یا غیرآلی مختلفی که دارای اشکال کروی، رشته ای یا صفحه‌ای هستند استفاده می‌شود (Cole and Bergeson, 2006). این فناوری روز به روز گسترش پیدا کرد و طی سال‌های اخیر استفاده از این نانو مواد در مورد فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر نیز مورد توجه قرار گرفته است (Kawasumi, 2004). تهیه نانو کامپوزیت‌ها در واقع تحول اساسی در تولید کامپوزیت‌ها محسوب می‌شود. چنانچه نانوذرات مورد استفاده از مواد طبیعی باشند، ارزش روش تهیه نانو کامپوزیت‌ها نیز بسیار بالا خواهد بود. اگرچه مواد بسته‌بندی طبیعی کاملاً جایگزین بسته‌بندی‌های سنتزی نگردیده‌اند، اما پتانسیل کاهش مصرف آن‌ها را دارند و با محدود کردن مهاجرت رطوبت، آروما، چربی و غیره از مواد غذایی منجر به حفظ کیفیت محصول می‌شوند (Silva et al., 2009).

برای تولید فیلم‌های طبیعی از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، چربی‌ها یا ترکیبی از این مواد استفاده می‌شود (Guilbert, 1986). تولید فیلم‌های مختلف در بسته‌بندی مواد غذایی یکی از کاربردهای مهم نانو کامپوزیت‌ها است که در این مورد عواملی نظیر مقاومت فیلم در مقابل آسیب‌های مکانیکی، نفوذپذیری نسبت به رطوبت و گاز، زیست تخریب‌پذیری، قابلیت حفظ تازگی فرآورده‌ها و جلوگیری از آلودگی مواد غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است. بنابراین انتخاب ترکیبات مناسب در تهیه فیلم‌های نانو کامپوزیتی و بهبود ویژگی‌های آنها مهم می‌باشد (Espitia et al., 2013; Sekhon, 2010).

واحدهای تشکیل‌دهنده پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه هستند. پروتئین‌های طبیعی موجود در مواد غذایی حداقل از ۲۰ اسید آمینه با زنجیرهای جانبی مختلف تشکیل شده‌اند. پروتئین‌ها هتروپلیمر هستند و ساختار ویژه آن‌ها توسط پیوندهایی که از نظر نوع، موقعیت و انرژی مختلف هستند پدیدار می‌گردد. ساختار اول پروتئین‌ها از اتصال اسیدهای آمینه مختلف توسط نوعی پیوند کوالانسی که پیوند پپتیدی نامیده می‌شود تشکیل می‌شود. بخش عمده‌ای از اسیدهای آمینه پروتئین‌ها را

مواد و روش‌ها

تولید نانوکریستال سلولز (NCC)

نانوسلولز مورد استفاده در تولید نانوکامپوزیت‌ها به روش شیمیایی طبق شیوه به کار برده شده توسط Xiaodong و همکاران (۲۰۰۷) با کمی تغییرات از پنبه به دست آمد. به منظور حذف ناخالصی‌ها و بالا بردن درجه خلوص سلولز، پنبه در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت در محلول سود ۲ درصد غوطه‌ور شد. در مرحله بعد شستشوی الیاف پنبه به منظور حذف کامل سود با آب مقطر انجام پذیرفت (از معرف فل فتالین برای تشخیص حذف کامل محلول سود از پنبه استفاده شد). هیدرولیز اسیدی با استفاده از سولفوریک اسید ۶۵٪ و با نسبت ۲۰ گرم اسید به ازای ۱ گرم در دمای ۵۰C به مدت ۳ ساعت تحت همزنی مداوم با سرعت ۶۰۰ rpm انجام پذیرفت. در مرحله بعد عمل خنثی‌سازی با سود ۱۰٪ تا رسیدن به pH ۵-۵/۵ صورت گرفت. سوسپانسیون به دست آمده در یخچال نگهداری گردید و پس از تعیین ماده خشک سوسپانسیون حاصل مقدار مورد نیاز در تولید فیلم‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه فیلم

برای تهیه تیمارهای مختلف پیشنهادی بر اساس طرح آماری (جدول ۱)، ابتدا ۱ گرم ژلاتین و ۱ گرم کربوکسی متیل سلولز در آب مقطر حل نموده تا بافتی به حالت یکنواخت ایجاد گردد. بعد از حل شدن ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز در آب، گلیسرول که رایج‌ترین نرم‌کننده مورد استفاده در تولید فیلم می‌باشد را به مقدار ۲۰ تا ۶۰ درصد بر اساس وزن بیوپلیمرها به سوسپانسیون اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه به حالت سکون قرار داده شد. به منظور انجام عمل ژلاتینیزاسیون، سوسپانسیون به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۹۰ درجه سلسیوس روی بن ماری قرار داده شد در این مدت جهت بهتر حل شدن و ژلاتینه شدن هر ۱۰ دقیقه محلول مورد نظر هم زده شد پس از گذشت یک ساعت نانوسلولز مشخص شده در فرمولاسیون پیشنهادی (در سطوح صفر تا ۳۰٪) بر مبنای وزن بیوپلیمر به محتویات ارلن اضافه گردید تا ویژگی‌های مورد آزمون کامپوزیت‌ها در دامنه وسیعی از سطوح مختلف نانوسلولز مورد مطالعه قرار گیرد و حجم آن به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و روی هیتر مگنت‌دار در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه حرارت‌دهی و مخلوط گردید. سوسپانسیون آماده شده را به وسیله پیپت در داخل پلیت‌های پلی‌استایرن شماره ۱۰ به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر منتقل گردید و جهت خشک شدن فیلم‌ها از آون با دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۴ ساعت استفاده شد.

و در مقابل ویژگی‌های مکانیکی آن همانند کشسانی بهبود یافت (Farris et al., 2011).

کربوکسی متیل سلولز (CMC) یکی از مشتقات سلولز بوده و بیوپلیمری خطی و محلول در آب است. CMC توانایی تشکیل فیلم‌های شفاف، پیوسته و یکنواخت را دارد (Choi & Simonsen, 2006). تاکنون مطالعات متعددی بر روی ویژگی‌های فیلم‌های حاصل از مشتقات سلولز و از جمله کربوکسی متیل سلولز انجام یافته است (Ayranci & Tunc, 2001, Park et al., 1993). نتایج مطالعات نشان داده است که فیلم‌های تهیه شده از CMC در بین بیوپلیمرها دارای مقاومت مکانیکی متوسطی بوده و به نفوذ روغن‌ها مقاوم و همچنین شفاف، فاقد بو و طعم می‌باشند (Park et al, 1993). Ghanbarzadeh و همکاران (۲۰۱۱) اثرات اسید اولئیک به عنوان یک ماده آبریز خوراکی را بر روی خواص بازدارندگی فیلم‌های CMC نسبت به بخار آب بررسی کردند. نتایج نشان داد، که مقاومت فیلم‌ها نسبت به رطوبت به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد (Ghanbarzadeh et al., 2011). همچنین Cheng و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که اضافه کردن روغن پالم اولئین به فیلم‌های CMC خواص بازدارندگی نسبت به بخار آب را بهبود می‌بخشد (Cheng et al., 2008). Almasi و همکاران (۱۳۸۸) در تحقیقی اظهار شده است که با افزایش میزان CMC در کامپوزیت‌های ناشسته- کربوکسی متیل سلولز نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم‌ها کاهش می‌یابد. کمترین نفوذپذیری نسبت به بخار آب در سطح ۱۵ درصد CMC به دست آمد (Almasi et al., 2010).

نانوسلولز از جمله نانوذراتی است که در طی سال‌های اخیر، تأثیر آن به عنوان نانوتقویت کننده، در پلیمرهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. مقاومت مکانیکی بالا، نسبت سطح به حجم زیاد، چگالی پایین، سهولت دسترسی، قیمت مناسب و زیست تخریب‌پذیری از جمله مهمترین ویژگی‌هایی است که نانوسلولز را از سایر نانوتقویت‌کننده‌ها متمایز می‌سازد. از این رو، تأثیر تقویت‌کنندگی این نانوذره، در پلیمرها و بیوپلیمرهای مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است (Almasi et al., 2010; Cherian et al., 2011; Kaushik et al., 2015). در سال‌های گذشته مطالعات گسترده‌ای در زمینه استفاده از نانوکریستال‌های پلی‌ساکاریدی مختلف با ماتریکس پلی‌مری و تولید بیونانوکامپوزیت‌ها از این طریق انجام گرفته است (Habibi & Dufresne, 2008). با توجه به اهمیت ترکیبات نانوکامپوزیتی در تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر و اثرات مطلوب ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز در تهیه این بیوفیلم‌ها، هدف از این تحقیق بررسی اثر گلیسرول و نانوسلولز بر ویژگی‌های نانوکامپوزیت‌های ژلاتین- کربوکسی متیل سلولز می‌باشد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای تعیین شکل نانوکریستال سلولز به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (فیلیپس، مدل XL30، هلند) استفاده شد. قدرت شتاب دهی الکترون ها ۲۸kV بوده و تصاویر با درشت نمایی‌هایی مختلف از ساختار نانوکریستال سلولز تهیه گردید.

پراش پرتو ایکس (XRD)

برای انجام آزمون پراش پرتو ایکس، پراش سنج (Panalytical Xpert PRO X Ray Diffractometer) مدل (Xpert Pro MPD) ساخت شرکت Panalytical هلند با آند مس استفاده شد. برای انجام آزمون، ژنراتور تولید اشعه ایکس در 30 ma (40 kv) تنظیم شده و نمونه‌ها در معرض اشعه ایکس با طول موج ۱/۵۴۰۵ Å قرار گرفتند. تشعشعات بازتابشی از نمونه، در دمای محیط و در محدوده زاویه $2\theta = 10-80^\circ$ جمع‌آوری و نمودار مربوط به شدت بازتابش آنها رسم گردید. سرعت اسکن ۱ ثانیه و اندازه گام‌ها $2\theta = 0.5^\circ$ بود. به منظور تعیین درصد کریستالینیتی نانوسلولز به دست آمده از روش Segal و همکاران (۱۹۵۹) استفاده شد بر طبق این روش میزان کریستالینیتی سلولز برابر است با:

$$CI = \frac{I_{002} - I_{AM}}{I_{002}} \times 100 \quad (۱)$$

CI: اندیس کریستالینیتی، I_{002} : شدت پیک در $2\theta = 22.7^\circ$ ؛ I_{AM} : شدت پیک در $2\theta = 18^\circ$ (Segal et al., 1959).

ضخامت

پس از خشک کردن محلول نانوکامپوزیت‌های تولید شده ضخامت بیوفیلیم‌های حاصل با استفاده از کولیس (Mitutoyo, Japan) با دقت ± 0.1 اندازه گرفته شد. بدین منظور سنجش ضخامت در ۵ قسمت مختلف بیوفیلیم‌ها صورت پذیرفت و میانگین ضخامت‌های اندازه‌گیری شده به عنوان ضخامت نانوکامپوزیت گزارش شده است.

شار بخار آب و نفوذپذیری (WVTR and WVP)

میزان شار بخار آب از میان بیوفیلیم و مقادیر نفوذپذیری بخار آب برای نانوکامپوزیت‌های حاصل تعیین گردیدند. برای محاسبه ویژگی‌های ذکر شده طبق روش ASTM E96-95 عمل شد. بدین منظور داخل ویال ۳ گرم سولفات کلسیم ریخته شده در این حالت رطوبت نسبی ایجاد شده داخل ویال صفر درصد خواهد بود پس از قرار دادن قطعه فیلم در سر بطری که به اندازه آن برش خورده بود درب بطری محکم بسته شد و بطری‌های داخل محفظه حاوی محلول اشباع سولفات پتاسیم قرار گرفت رطوبت نسبی ایجاد شده داخل محفظه ۹۷٪ خواهد بود. جهت ایجاد امکان انتقال بخار آب از میان بیوفیلیم منفذی

به قطر ۵ میلی‌متر بر روی درب بطری ایجاد شده بود. بطری‌ها قبل از قرار گرفتن داخل محفظه و هر ۲۴ ساعت به مدت ۴ روز توزین شدند. با رسم نمودار افزایش وزن بطری در مقابل زمان برای هر نمونه و به دست آوردن شیب خط حاصل شار بخار آب و نفوذپذیری نسبت به بخار آب از معادلات زیر تعیین شد:

$$WVTR = \frac{\Delta w}{tA} \quad (۲)$$

$$WVP = \frac{WVTR \times X}{P(R_1 - R_2)} \quad (۳)$$

WVTR: (g/sm^2) ، WVP: آهنگ انتقال بخار آب $(gm/m^2.sPa)$ ، Δw : افزایش وزن (g) ، t : زمان (s) ، A : مساحت فیلم در معرض انتقال بخار آب (m^2) ، X : ضخامت فیلم (m) ، P : فشار بخار آب (Pa) ، R_1 : رطوبت نسبی داخل دسیکاتور $(\%)$ ، R_2 : رطوبت نسبی داخل ویال $(\%)$

حلالیت در آب

حلالیت در آب عبارت است از درصد ماده خشک فیلم که پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در آب مقطر، به حالت محلول در می‌آید. برای اندازه‌گیری میزان حلالیت در آب ماده خشک اولیه نمونه‌های فیلم با ابعاد $20 \times 20 \times 2.0$ mm در $105^\circ C$ تعیین گردید. در مرحله بعد نمونه‌های بیوفیلیم داخل ظروف درب‌دار حاوی ۵۰ ml آب مقطر در دمای $25^\circ C$ به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور گردید و پس از سپری شدن زمان مقدار باقیمانده فیلم از آب خارج شده و ماده خشک آن تعیین شد مقدار حلالیت مربوط به هر نمونه از معادله زیر به دست آورده شد (Romero-Bastida et al., 2005):

$$WS = \frac{DM_1 - DM_2}{DM_1} \times 100 \quad (۴)$$

WS: حلالیت در آب $(\%)$ ، DM_1 : ماده خشک اولیه فیلم $(\%)$ ، DM_2 : ماده خشک فیلم پس از غوطه‌وری در آب $(\%)$.

جذب رطوبت

برای اندازه‌گیری میزان جذب رطوبت نمونه‌های نانوکامپوزیت قطعاتی از فیلم با ابعاد $20 \times 20 \times 2.0$ mm در $50^\circ C$ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد پس از توزین، نمونه‌ها در محفظه حاوی محلول اشباع سولفات پتاسیم ($RH = 97\%$) در دمای $25^\circ C$ قرار داده شدند و پس از گذشت ۴ روز مجدد توزین شدند. میزان جذب رطوبت از رابطه زیر محاسبه شد (Angles and Dufresne, 2001):

$$MA = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (۵)$$

MA: جذب رطوبت $(\%)$ ، W_1 : وزن اولیه اولیه فیلم (g) ، W_2 : وزن نهایی فیلم (g)

زاویه تماس

$$YI=(142/86b)/L \quad (7)$$

$$WI=100-[(100-L)^2+a^2+b^2]^{0.5} \quad (8)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

۱۲ تیمار مختلف حاوی غلظت‌های مشخص گلیسرول و نانوسلولز بر اساس طرح مرکب مرکزی و به شیوه سطح پاسخ تولید شده‌اند در مورد تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تجزیه واریانس با نرم‌افزار Minitab 18 استفاده شد. انجام محاسبات و رسم برخی از نمودارها در نرم‌افزار Microsoft office excel صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

نانوسلولز

پس از تولید نانوسلولز جهت ارزیابی ماده تولید شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و آزمون پراش اشعه ایکس استفاده شد. ارزیابی‌ها نشان داد ابعاد نانوسلولز تولید شده در محدوده ۱۰۸-۵۴ نانومتر قرار دارد از آنجایی که ابعاد اندازه گرفته شده زیر ۱۰۰ نانومتر می‌باشد لذا می‌توان ادعا کرد ماده حاصل در زمره مواد نانویی قرار می‌گیرد (Jordan et al., 2005).

در مورد تعیین کریستالینیتی ۳ پیک در گراف حاصل از آزمون پراش اشعه ایکس پدید آمد. وجود پیک در گراف اشعه ایکس حاکی از آن است که نمونه مورد آزمایش حاوی ساختار کریستالی است. پیک‌های مشاهده شده در زاویه‌های ۱۴/۶، ۱۶/۶ و ۲۲/۷ درجه قرار دارند. طبق رابطه سگال (۵-۲) میزان کریستالینیتی در نانوکریستال سلولز برابر است با نسبت میزان ناحیه کریستالی به کل ماده (که شامل مناطق کریستالی و آمورف است). پیک به‌دست آمده در ۲۲/۷ درجه نشان دهنده ناحیه کریستالی و آمورف و پیک به‌دست آمده در ۱۸ درجه نماینده ناحیه آمورف می‌باشد. محاسبات نشان داد درصد کریستالینیتی نانوسلولز به‌دست آمده برابر با ۸۲/۱۰٪ است. این مقدار بیشتر از اندیس کریستالینیتی به‌دست آمده برای ساقه ذرت، کاج نروژی و فیبر کنف می‌باشند که به‌ترتیب ۴۷، ۴۷ و ۷۷ درصد گزارش شده اند ولی تقریباً برابر با مقدار کریستالینیتی سلولز فیلتر شده کاغذ (۸۳٪) می‌باشد (Thygesen et al., 2005). هر واحد سلولز از ۳ گروه هیدروکسیل تشکیل شده است گروه‌های هیدروکسیل و توانایی آنها در ایجاد پیوندهای هیدروژنی نقش مهمی در ایجاد ساختار کریستالی و خواص فیزیکی سلولز ایفا می‌کند. در گیاهان سلولزی، سلولز به شکل آمورف وجود دارد که توسط پیوندهای هیدروژنی بین ملکولی و داخل ملکولی به بخش‌های کریستالی متصل شده است (Klemm, 2005).

از آنجایی که فیلم‌های کربوهیدراتی ماهیت آبدوستی دارند، اندازه گیری زاویه تماس آب، شاخص خوبی برای تعیین میزان آبدوست بودن آنها محسوب می‌شود (Ghanbarzadeh et al., 2007). برای تعیین زاویه تماس، از روش قطره سیسیل که یک روش رایج در تعیین ویژگی مرطوب شوندگی سطوح جامد می‌باشد استفاده شد. با استفاده از یک سرنگ، یک قطره آب مقطر بر روی سطح نمونه‌ها قرار داده شد. توسط دوربین Canon sx500 با وضوح ۱۶ مگا پیکسل از تماس قطره با سطح فیلم پس از گذشت ۵ ثانیه عکس گرفته شد. برای محاسبه زاویه تماس آب با سطح فیلم از نرم‌افزار Image J 1.44p استفاده شد. محاسبه زاویه بین خط مماس بر قطره در نقطه تماس و خط رسم شده در راستای سطح فیلم، زاویه تماس را نشان می‌دهد.

خواص مکانیکی

تعیین خواص مکانیکی توسط دستگاه آزمون سنج مکانیکی بروکفیلد (CT3، آمریکا) انجام یافت. استحکام کشش نهایی (حداکثر تنش است که یک ماده می‌تواند تحمل کند بدون این که دچار کرنش دائمی گردد) بر حسب مگاپاسکال و کشش در نقطه شکست یا نسبت افزایش طول (ΔL) به طول اولیه فیلم بر حسب درصد فیلم‌ها طبق استاندارد ASTM D882-91 اندازه‌گیری گردیدند. از هر یک از فیلم‌ها نمونه به شکل تسمه با ابعاد ۱ cm × ۸ cm بریده شد و بین دو فک دستگاه قرار گرفت. فاصله بین دو فک دستگاه ۳/۵ cm و سرعت حرکت فک بالایی ۱ mm/s می‌بود.

رنگ سنجی

رنگ و شفافیت نمونه‌ها داخل جعبه سیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام نمونه‌ها روی یک صفحه سفید استاندارد ($a = -1.64$, $L = 87.99$, $b = -9.09$) قرار گرفتند و از سطح نمونه‌ها از فاصله ۱۰ سانتی‌متری توسط دوربین دیجیتال تصویر تهیه شد. با استفاده از نرم‌افزار Image J 1.43u پارامترهای رنگی نمونه‌ها در سیستم RGB استخراج گردید. سپس RGB محاسبه شده به پارامترهای هانتر بر حسب روشنایی (L)، قرمزی-سبز (a) و زردی-آبی (b) تبدیل شد و میزان رنگ بر حسب پارامترهای هانتر بیان شد. اختلاف رنگ نمونه‌ها (ΔE) با فرمول پیشنهادی Gennadios و همکاران (۱۹۹۶) و اندیس زردی (YI) و اندیس سفیدی (WI) نمونه‌ها با فرمول پیشنهادی Huxsoll و Boun (۱۹۹۱) محاسبه گردید:

$$\Delta E = [(L_{\text{standard}} - L_{\text{sample}})^2 + (a_{\text{standard}} - a_{\text{sample}})^2 + (b_{\text{standard}} - b_{\text{sample}})^2]^{0.5} \quad (6)$$

نفوذپذیری نسبت به بخار آب

نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم‌های حاصل در محدوده 10^{-12} تا 10^{-11} $\text{gm/m}^2\text{Pas}$ قرار دارد (جدول ۱). کمترین مقدار نفوذپذیری نسبت به بخار آب زمانی به دست می‌آید که از سطوح پایین نانوکریستال سلولز در حد ۴/۴ درصد استفاده شده باشد. نانوذرات می‌توانند با افزایش ارتباطات عرضی بین زنجیره‌های پلیمر به عنوان فیلر و کاهش قدرت حرکتی زنجیره‌های پلیمری به علت پرکردن فضاهای خالی در ماتریکس پلیمر موجب کاهش نفوذپذیری نسبت به بخار آب می‌شوند (Rouhi et al. 2013). استفاده از مقادیر زیاد نانوکریستال سلولز موجب شده است به دلیل تجمع فیلر نفوذپذیری نسبت به بخار آب در حد شانزده برابر افزایش یابد. از دیدگاه آماری نیز تنها عامل تاثیرگذار بر میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب توان دوم نانوکریستال سلولز بوده است ($p < 0.05$). نانوسلولز توانسته است نقش خود را به عنوان فیلر در غلظت‌های پایین به خوبی ایفا نماید و با ایجاد مسیر پر پیچ و خم در برابر مسیر حرکت ملکول‌های آب خاصیت ممانعتی نانوکامپوزیت‌های تولید شده را بهبود بخشد.

فیلم‌های خالص ژلاتین مقادیر بالای نفوذپذیری نسبت به بخار آب را از خود نشان می‌دهند (بیش از پانصد برابر نسبت به مطالعه حاضر) در مطالعه انجام یافته مقدار 10^{-9} $\text{gm/m}^2\text{Pas}$ برای فیلم خالص ژلاتین به دست آورده شد (Shankar et al. 2015). این در حالی است با افزودن نانواکسید روی نه تنها از میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب کاسته نشد بلکه افزودن نانوذره باعث افزایش در نفوذپذیری نسبت به

بخار آب نیز گردید. می‌توان اظهار داشت احتمالاً نوع نانوماده استفاده شده و نوع پلیمر در میزان قدرت ممانعت‌کنندگی نانوماده استفاده شده تاثیر دارد.

تولید کامپوزیت با ترکیب ۲۰٪ کربوکسی متیل سلولز به همراه ۸۰٪ ژلاتین حاوی ۳۰٪ گلیسرول سبب شد تا میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب 10^{-10} $\text{gm/m}^2\text{Pas}$ به دست آید. افزودن صمغ زانتان باعث افزایش نفوذپذیری نسبت به بخار آب در مطالعه مذکور شد (Nur et al., 2016). ولی در تیمار شماره یک مطالعه حاضر که مقدار گلیسرول استفاده شده نزدیک به مقدار گلیسرول به کار برده شده در مطالعه مذکور است مقدار نفوذپذیری نسبت به بخار آب برابر با 10^{-12} $\text{gm/m}^2\text{Pas}$ است که نشان‌دهنده تاثیر نانوسلولز به کار برده شده در فرمولاسیون تیمار مذکور است. اتصالات عرضی سبب تغییر در ساختار شبکه ژلاتین و افزایش میزان نفوذپذیری می‌شود (de Carvalho et al., 2004). لذا افزودن صمغ زانتان به ترکیب ژلاتین- کربوکسی متیل سلولز نتوانسته است نفوذپذیری نسبت به بخار آب را بهبود بخشد برعکس سبب افزایش میزان نفوذپذیری نیز شده است در صورتی که استفاده از نانوسلولز در تحقیق حاضر به دلیل پر کردن فضاهای خالی ماتریکس پلیمری سبب کاهش نفوذپذیری گردیده است. مقادیر نفوذپذیری نسبت به بخار به دست آمده (10^{-10} $\text{gm/m}^2\text{Pas}$) تا $1/49 \times 10^{-10}$ برای فیلم‌های ژلاتین حاوی سطوح مختلف دی آلدئید کربوکسی متیل سلولز به عنوان عامل اتصال‌دهنده عرضی نیز بیشتر از مطالعه حاضر می‌باشد (Mu et al. 2012).

جدول ۱- ترکیب تیمارهای مختلف و ویژگی‌های اندازه گیری شده شامل ضخامت، نفوذپذیری نسب به بخار آب و مشخصه‌های رنگی نانوکامپوزیت‌ها
Table 1. The combination of different treatments and measured characteristics including thickness, water vapor permeability and color characteristics of nanocomposites

Treatments تیمار	Glycerol (%) گلیسرول	NCC (%) نانوسلولز	Thickness (μm) ضخامت	WVP ($\times 10^{-12}$ $\text{gm/m}^2\text{sPa}$)	ΔE	YI	WI
1	26	4.4	50	2.23	3.01	0.04	83.77
2	26	25.6	50	11.17	4.50	0.08	82.74
3	54	4.4	30	5.36	4.58	0.09	82.95
4	54	25.6	80	17.87	2.38	0.04	84.39
5	40	0	30	2.68	2.16	0.05	84.99
6	40	30	70	12.51	2.39	0.06	85.21
7	20	15	80	21.44	2.40	0.04	84.45
8	60	15	120	16.08	4.12	0.08	83.64
9	40	15	160	71.46	2.69	0.05	84.34
10	40	15	135	60.30	4.58	0.09	82.95
11	40	15	45	12.06	6.04	0.12	82.08
12	40	15	90	36.18	3.03	0.06	84.05

شده به میزان زیادی بهبود یابد. این امر حتی در سطوح بالای گلیسرول نیز مشاهده می‌شود. سطوح مختلف گلیسرول استفاده شده در تحقیق حاضر اثر معنی‌دار بر نفوذپذیری نسبت به بخار آب نداشته است و تغییر

استفاده از ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز به میزان مساوی در مطالعه حاضر از یک سو و استفاده از نانوکریستال سلولز از سوی دیگر سبب شده است تا میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم‌های تولید

است (Tong et al., 2008). این محققین دلیل زیاد بودن نفوذپذیری نسبت به بخار آب را بزرگ بودن گروه‌های آنیونی جانبی کربوکسی متیل سلولز می‌دانند که سبب افزایش فضای خالی در ماتریکس پلیمر خواهد شد.

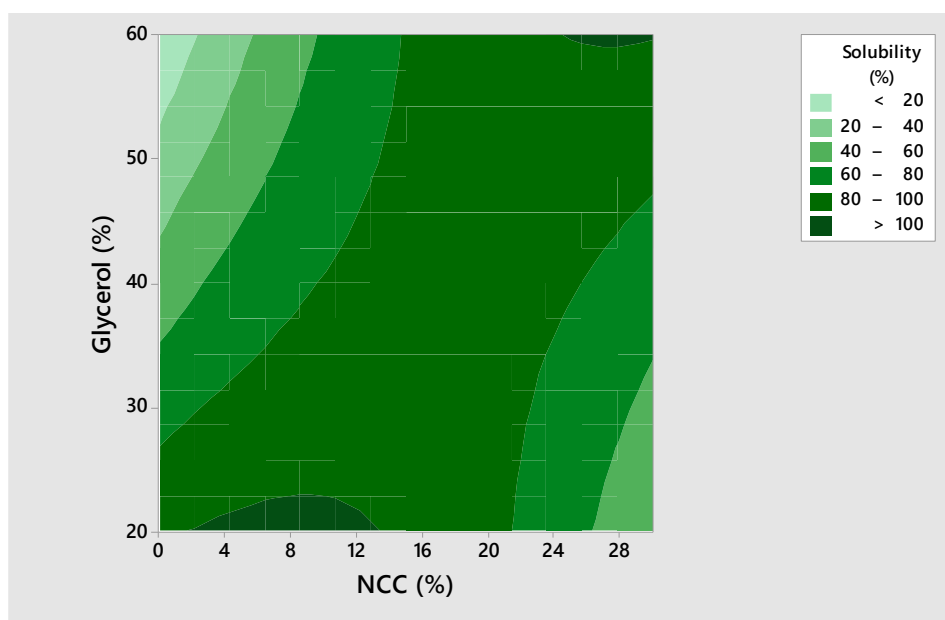
حالات در آب

کامپوزیت‌های تولید شده به‌عنوان لایه محافظ مواد غذایی استفاده می‌شوند از این رو میزان حالات در آب کامپوزیت‌های تولید شده یکی از ویژگی‌های مهم این نوع از فیلم‌ها می‌باشد تا بتواند نقش محافظتی خود را به‌خوبی ایفا نماید. فیلم‌های تولید شده در اغلب مواد از حالات بالایی در آب برخوردار بودند (شکل ۱). اگرچه زیاد بودن حالات در زیست تخریب‌پذیری فیلم‌های تولید شده عامل مطلوبی محسوب می‌شود ولی کاربرد فیلم‌های تولید شده به‌عنوان ماده بسته‌بندی را محدود می‌سازد. آنالیز آماری حاکی از آن است که نانوسلولز، توان دوم نانوسلولز، میزان گلیسرول استفاده شده و اثر متقابل نانوسلولز و گلیسرول بر حالات فیلم‌ها معنی‌دار است ($p < 0.01$). معادله زیر با ضریب همبستگی ($R^2 = 97.03$) در خصوص ارتباط حالات در آب و عوامل مورد استفاده به‌دست آمده است:

$$\text{Solubility} = 149.2 - 0.648\text{NCC} - 2.698\text{Glycerol} - 0.1253\text{NCC} * \text{NCC} + 0.1268\text{NCC} * \text{Glycerol} \quad (9)$$

در میزان گلیسرول در تیمارهای مختلف سبب تغییر جزئی در مورد این ویژگی شده است. به‌طور معمول افزودن گلیسرول موجب افزایش نفوذپذیری نسبت به بخار آب می‌شود (Tong et al., 2008) افزودن کربوکسی متیل سلولز و درگیر شدن دو پلیمر در ماتریکس می‌تواند موجب از دسترس خارج شدن گروه‌های آبدوست بیوپلیمر شده و میزان نفوذپذیری نسبت به آب فیلم خالص ژلاتین کاهش یابد. افزودن نانوسلولز با ایجاد مسیر پر پیچ و خم بر سر راه ملکول‌های آب موجب می‌شود تا نفوذپذیری نسبت به بخار آب کاهش یابد (Kristo & Biliaderis, 2007).

در غلظت‌های بالای استفاده شده نانوکریستال سلولز موجب افزایش نفوذپذیری نسبت به بخار آب کامپوزیت‌های تولید شده می‌شود این موضوع در غلظت‌های بالای نانوسلولز یعنی بیش از ۱۵ درصد کاملاً مشهود است به نحوی که مقدار نفوذپذیری نسبت به بخار آب در غلظت ۴۰ درصد گلیسرول و ۱۵ درصد نانوسلولز $\text{gm/m}^2\text{Pas}$ 10^{-11} به‌دست آمد حتی این مقدار بیشتر از عدد به‌دست آمده برای کامپوزیت تولید شده بدون افزودن نانوسلولز است. البته این مقدار هنوز بسیار کمتر از مقدار گزارش شده برای فیلم خالص کربوکسی متیل سلولز (Dashipour et al. 2015) و برای فیلم خالص ژلاتین می‌باشد (Shankar et al. 2015). نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم خالص کربوکسی متیل سلولز $\text{gm/m}^2\text{Pas}$ 10^{-10} $3/6 \times$ به‌دست آورده شده



شکل ۱- نمودار کنتور حالات در آب نانوکامپوزیت‌ها حاوی سطوح مختلف گلیسرول و نانوکریستال سلولز
Fig 1. Contour plot of solubility in water of nanocomposites contain different glycerol and NCC levels

گلیسرول زیاد و نانوکریستال سلولز زیاد در فرمولاسیون خود بودند، اگرچه به‌طور کامل در آب حل نشدند ولی حالات زیادی در آب داشتند.

تیمار حاوی ۲۰ درصد گلیسرول و ۱۵ درصد نانوکریستال سلولز به‌طور کامل در آب حل شده بود به همین شکل نمونه‌هایی که حاوی

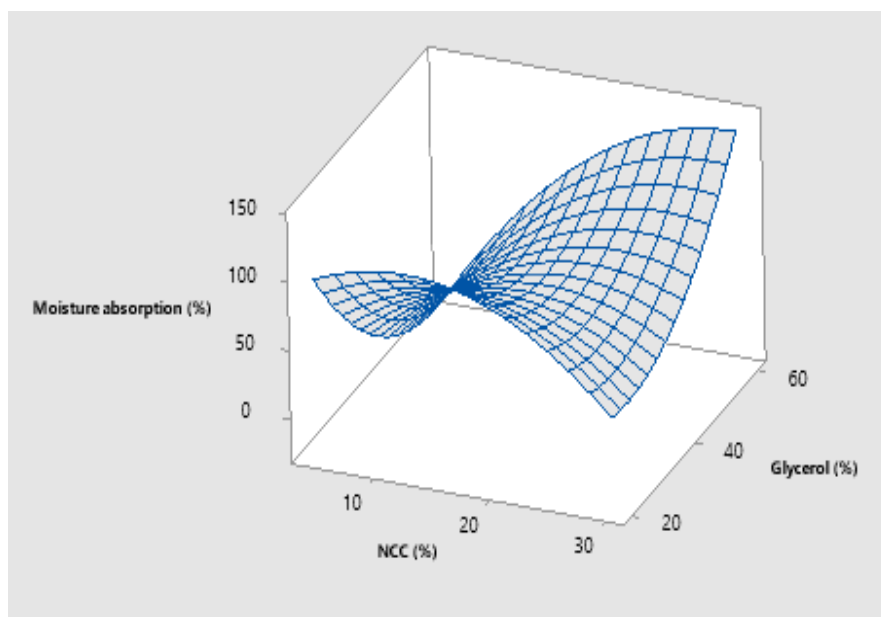
مشخص شده است افزودن نانوکیتین به ژلاتین باعث تغییر در میزان حلالیت فیلم‌های تولید شده نگردید (Sahraee et al., 2017a). افزایش حلالیت فیلم‌های متیل سلولز با افزودن پلاستی سایزر توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است زمانی که از پلاستی‌سایزر استفاده نمی‌شود در این صورت پیوندهای هیدروژنی قوی بین زنجیره‌های متیل سلولز ایجاد می‌شود و سرعت حلالیت پایین است ولی با افزودن پلاستی‌سایزر و جاگیری آن بین رشته‌های متیل سلولز پیوندهای بین زنجیره‌ای متیل سلولز گسسته شده و پیوندهای هیدروژنی بین پلاستی‌سایزر و متیل سلولز تشکیل می‌شوند که سبب به هم خوردن شبکه سه‌بعدی متیل سلولز و باعث افزایش حلالیت در آب فیلم نرم شده می‌گردد (Turhan and Şahbaz 2004).

جذب رطوبت

ژلاتین به‌عنوان ترکیب آبدوست و با قدرت جذب آب بالا شناخته می‌شود. نتایج حاصل از آزمون جذب رطوبت حاکی از آن است نانوکامپوزیت‌های تولید شده از قدرت جذب رطوبت بالایی برخوردار هستند (شکل ۲).

ماهیت آبدوستی ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز که در تولید کامپوزیت‌ها به کار برده شده‌اند می‌تواند دلیل زیاد بودن حلالیت فیلم‌های تولید شده باشد. حلالیت فیلم خالص ژلاتین ۶۶ درصد گزارش شده است که با افزودن نانوکلی از حلالیت فیلم‌ها کاسته می‌شود (Farahnaky et al., 2014). در صورتی که در مطالعه حاضر افزودن نانوسلولز باعث کاهش حلالیت نگردیده است این امر می‌تواند به دلیل آبدوست بودن خود نانوماده به کار برده شده در تحقیق حاضر باشد. در صورتی که تیمار تهیه شده بدون حضور نانوسلولز نسبت به بقیه تیمارها از حلالیت کمتری برخوردار بود مقدار به‌دست آمده در خصوص حلالیت در آب این نمونه برابر ۴۸/۶۲ درصد می‌بود که در واقع کمترین حلالیت به‌دست آمده در بین نمونه‌های تولید شده می‌باشد.

همانگی و ارتباط بین بیوپلیمرها می‌تواند با ایجاد برهمکنش‌های قوی و از دسترس خارج نمودن گروه‌های آبدوست موجب کاهش حلالیت کامپوزیت‌های تولید شده گردیده باشد این وضعیت با افزودن نانوسلولز به هم خورده و احتمالاً ارتباط بین بیوپلیمرها گسسته شده است در این صورت با توجه به ماهیت آبدوست ماتریکس و فیلر حلالیت در آب نانوکامپوزیت‌ها افزایش یافته است. در تحقیق دیگری نیز



شکل ۲- نمودار سطح-پاسخ جذب رطوبت نانوکامپوزیت‌ها حاوی سطوح مختلف گلیسرول و نانوکریستال سلولز
Fig 2. Response-surface plot of moisture absorption of nanocomposites contain different glycerol and NCC levels

حضور نانوکریستال سلولز به‌عنوان پرکن در این زمینه بی‌تاثیر نیست. در مقادیر پایین نانوکریستال سلولز وارد فضاهای خالی ایجاد شده در ماتریکس فیلم می‌شود و از حرکت آزادانه ملکول‌های آب ممانعت به عمل می‌آورد ولی با افزایش سطوح نانوکریستال سلولز استفاده شده به دلیل تجمع پرکن نمی‌تواند نقش خود را ایفا نماید. بیشترین مقدار جذب

وارد شدن نرم‌کننده بین زنجیره‌های پلیمر باعث گسسته شدن پیوندها شد و پیوندهای هیدروژنی جدیدی می‌تواند بین نرم‌کننده و ماتریکس تشکیل گردید (Turhan et al., 2001). تشکیل این پیوندها سبب از دسترس خارج شدن گروه‌های هیدروکسیل خواهد شد در نتیجه با افزایش میزان گلیسرول از مقادیر جذب رطوبت کاسته می‌شود البته

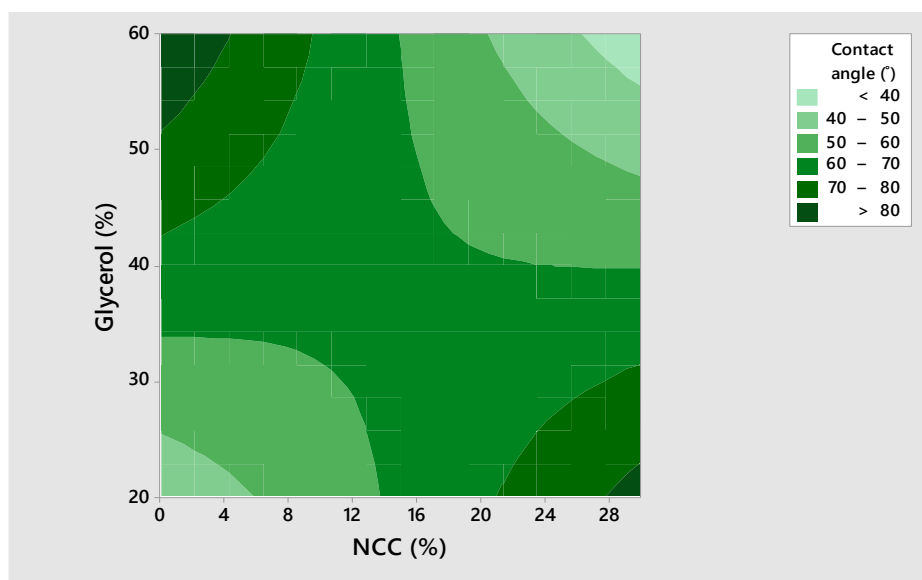
بیوپلیمری به رطوبت به حساب آید. در حال حاضر استفاده از تکنیک‌های پردازش تصویر در صنایع غذایی در حال گسترش می‌باشد که ضمن سریع و کم هزینه بودن جزء روش‌های غیرمخرب نیز محسوب می‌شوند (Du and Sun 2004). همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در اغلب تیمارها زاویه تماس قطره آب با سطح در حدود ۶۰ درجه می‌باشد از آنجایی که اثر متقابل بین نانوکریستال سلولز و گلیسرول بر زاویه تماس قطره آب با سطوح فیلم‌ها اثر معنی‌دار دارد ($p < 0.05$). می‌توان اظهار داشت در سطوح ثابت نانوکریستال سلولز با افزایش مقدار گلیسرول زاویه تماس کاهش یافته است چرا که گلیسرول به عنوان یک ترکیب چندانالکلی از خاصیت آبدوستی زیادی برخوردار است. معادله زیر با ضریب همبستگی ($R^2 = 78.24$) در خصوص ارتباط زاویه تماس و عوامل مورد استفاده به دست آمده است:

$$\text{Contact angle} = 17.7 - 0.0790 \text{ NCC} * \text{Glycerol} \quad (10)$$

رطوبت در کامپوزیتی با ۵۴ درصد گلیسرول و ۲۶ درصد نانوکریستال سلولز برابر با ۱۷۴/۶۶ درصد به دست آمده است بعد از آن بیشترین مقدار جذب رطوبت متعلق به تیماری با ۲۰ درصد گلیسرول و ۱۵ درصد نانوسلولز برابر با ۱۵۲/۲۱ درصد است. تشکیل پیوندهای هیدروژنی و به تبع آن کاهش جذب رطوبت با افزودن کربوکسی متیل سلولز به فیلم‌های نشاسته نیز گزارش شده است (Ghanbarzadeh et al., 2010).

زاویه تماس

در مورد فیلم‌های بیوپلیمری که از آبدوستی بالاتری برخوردارند تعیین میزان آبدوستی و قابلیت مرطوب شوندگی سطحی فیلم‌ها با آزمون زاویه تماس که یکی از آزمون‌های رایج در این زمینه می‌باشد می‌تواند یک روش خوب برای تعیین میزان حساسیت فیلم‌های



شکل ۳- نمودار کنتور زاویه تماس نانوکامپوزیت‌ها حاوی سطوح مختلف گلیسرول و نانوکریستال سلولز

Fig 3. Contour plot of water drop contact angle of nanocomposites contain different glycerol and NCC levels

افزایش یافته است گرچه تفاوت معنی‌دار بین سطوح مختلف نانوکیتین استفاده شده مشاهده نگردید محققین دلیل این افزایش را به سبب توانایی نانوکیتین در ایجاد پیوندهای هیدروژنی و آمیدی بین کیتین و ژلاتین می‌دانند (Sahraee et al., 2017b).

کاهش زاویه تماس با افزودن مونت موریلونیت به فیلم کربوکسی متیل سلولز مشاهده است مقدار زاویه تماس برای فیلم خالص کربوکسی متیل سلولز ۴۵/۳۷ درجه به دست آورده شده است که با افزودن ۱۰٪ مونت موریلونیت به ۳۶/۵۳ درجه کاهش می‌یابد (Quilaqueo Gutiérrez et al. 2012). این محققین دلیل کاهش

همچنین برهمکنش‌های بین گروه‌های قطبی و هیدروکسیلی ترکیبات مورد استفاده در ساخت کامپوزیت‌ها سبب شده است تا شاهد رفتارهای متفاوتی در بین تیمارهای مختلف باشیم به عنوان مثال در سطوح متوسط گلیسرول عدم استفاده از نانوکریستال سلولز سبب افزایش زاویه تماس شده است و مقدار زاویه تماس برای تیماری حاوی ۴۰ درصد گلیسرول و بدون حضور نانوکریستال سلولز ۶۸/۶۹ درجه به دست آمده است. در صورتی که در سطوح دیگر گلیسرول حضور نانوکریستال سلولز باعث بهبود مقادیر زاویه تماس آب با سطح شده است. زاویه تماس قطره آب با سطح فیلم خالص ژلاتین ۸۰ درجه گزارش شده است با افزودن نانوکیتین به ژلاتین مقدار زاویه تماس

زاویه تماس را افزایش خاصیت آبدوستی فیلم‌ها با افزودن مونت موریلونیت می‌دانند

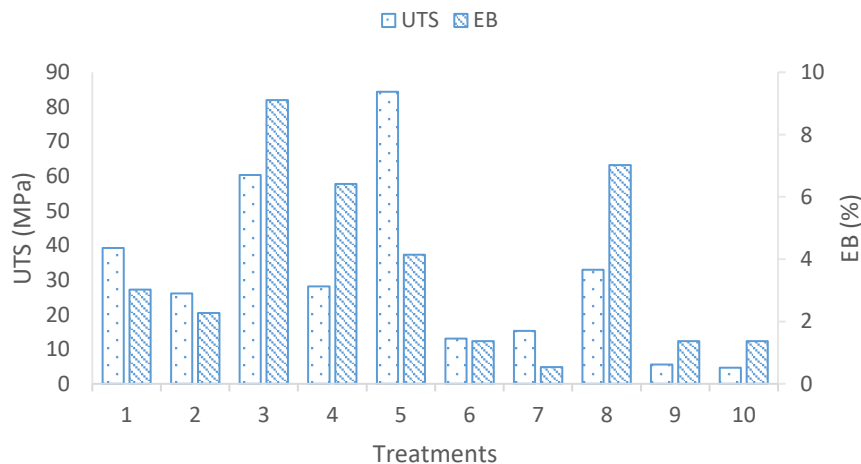
دلیل پایین بودن زاویه تماس در تحقیق حاضر می‌تواند به خاطر استفاده از کربوکسی متیل سلولز باشد که فیلم‌های تهیه شده از آن زاویه تماس کمی دارند. همین‌طور استفاده از نانوکریستال سلولز به عنوان یک فیلر آبدوست می‌تواند مزید علت در کاهش زاویه تماس قطره آب با سطوح فیلم باشد. سولفاناسیون سلولز حین تهیه نانوسلولز در روش هیدرولیز اسیدی به خاصیت آبدوستی نانوسلولز اضافه می‌کند (Morais et al. 2013). در صورت استفاده از فیلرهای هیدروفوب مانند نانوذرات نقره زاویه تماس افزایش و سطح کامپوزیت حاصل خاصیت هیدروفوب پیدا خواهد کرد (Rhimi et al., 2013). افزایش زاویه تماس در تحقیق حاضر نسبت به فیلم خالص کربوکسی متیل سلولز نیز می‌تواند به دلیل استفاده از ژلاتین در تهیه نانوکامپوزیت باشد البته با افزایش نانوسلولز زاویه تماس کاهش یافته است.

خواص مکانیکی

فیلم‌های بر پایه ژلاتین به‌طور معمول شکننده هستند و خواص مکانیکی ضعیفی از خود نشان می‌دهند. در حالت کلی میزان ازدیاد طول در نقطه شکست فیلم‌های تولید شده کمتر از ۱۰ درصد می‌باشد و این میزان تنها در فیلم‌های با بیش از ۵۰ درصد گلیسرول مشاهده

می‌شود در تیمارهایی که از سطوح کمتر گلیسرول استفاده شده است. ازدیاد طول در نقطه شکست به زیر ۵ درصد تقلیل می‌یابد (شکل ۴). آنالیز آماری نیز نشانگر این است گلیسرول بر مقدار ازدیاد طول در نقطه شکست تأثیر معنی‌دار دارد ($p < 0.01$). افزودن نانورس تا میزان ۵ درصد به فیلم‌های خالص ژلاتین سبب افزایش ازدیاد طول در نقطه شکست می‌شود در صورتی که بیش از این مقدار افزودن نانوکلی سبب کاهش ازدیاد طول در نقطه شکست خواهد شد (Lim et al., 2010). استحکام کششی برای فیلم‌های تهیه شده از کربوکسی متیل سلولز خالص ۱۷/۷۵ مگاپاسکال و ازدیاد طول در نقطه شکست ۲۶/۸۶ درصد گزارش شده است (Dashipour et al. 2015). کاهش ازدیاد طول در نقطه شکست در تحقیق حاضر می‌تواند به دلیل استفاده از ژلاتین در تهیه کامپوزیت‌ها باشد که از طرف دیگر به کار بردن ژلاتین سبب شده است تا استحکام کششی فیلم‌های تولید شده چند برابر افزایش یابد.

در خصوص استحکام کششی فیلم‌های حاصل از قدرت بالایی برخوردار هستند به‌طوری که حداکثر استحکام کششی ۸۴/۳۷ مگاپاسکال به‌دست آمد این مقدار در مورد تیماری است که از ۴۰ درصد گلیسرول بدون افزودن نانوسلولز تهیه شده بود افزودن نانوسلولز به مقدار ۴ درصد باعث کاهش جزئی در استحکام کششی می‌شود البته از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین این دو تیمار وجود ندارد ولی در مقادیر بالاتر نانوسلولز استحکام کششی نیز کاهش می‌یابد.



شکل ۴- استحکام کششی نهایی و کشش در نقطه شکست نانوکامپوزیت‌های ژلاتین- کربوکسی متیل سلولز

Fig. 4. UTS and EB of gelatin- carboxy methyl cellulose nanocomposites

افزودن نانوکیتین یا نانوذرات اکسید روی کاهش در مقادیر استحکام کششی و افزایش در ازدیاد طول در نقطه شکست به جز برای تیمار حاوی ۳ درصد نانوکیتین مشاهده گردید (Sahraee et al., 2017b). بر اساس گفته این محققین وارد شدن نانوذرات به ماتریکس پلیمر

آنالیز آماری نشانگر این است نانوسلولز و توان دوم نانوسلولز در سطح بر استحکام کششی فیلم‌های تولید شده تأثیر معنی‌دار دارد. استحکام کششی برای فیلم‌های خالص ژلاتین ۶۵/۲۰ مگاپاسکال و ازدیاد طول در نقطه شکست ۴/۶۴ درصد به‌دست آمده است که با

ممکن است سبب کاهش ارتباطات بین ملکولی در ژلاتین شده و استحکام کششی را کاهش دهد لذا کاهش استحکام کششی با افزودن نانوسلولز به فیلم‌های ژلاتین-کربوکسی متیل سلولز می‌تواند به همین دلیل باشد چرا که ویژگی‌های مکانیکی تابع برهمکنش‌های داخل و بین ملکولی هستند (Chambi and Grosso, 2006).

استفاده از صمغ زانتان در تحقیقی که توسط Nur Hazirah و همکاران (۲۰۱۶) صورت گرفته است به دلیل تضعیف نیروی‌های بین ملکولی سبب کاهش استحکام کششی می‌شود علاوه بر این با افزودن صمغ زانتان انعطاف‌پذیری نیز کاهش می‌یابد (Nur Hazirah et al., 2016). ولی به کار بردن نانوسلولز سبب تقویت ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌های ژلاتین-کربوکسی متیل سلولز می‌شود. علاوه بر این فیلم‌های تهیه شده از ژلاتین که از دی‌آلدئید کربوکسی متیل سلولز به عنوان اتصال‌دهنده عرضی در ترکیب آنها استفاده شده بود استحکام کششی پایین‌تری از خود نشان دادند (۱۵/۱۳ MPa - ۴/۷۶) (Mu et al., 2012). با مقایسه نتایج مطالعات انجام یافته توسط Nur Hazirah و همکاران (۲۰۱۶) و Mu و همکاران (۲۰۱۲) که از اتصال‌دهنده‌های عرضی جهت بهبود خواص فیلم ژلاتین استفاده کرده اند با مطالعه حاضر می‌توان اظهار داشت جهت اصلاح ویژگی‌های فیلم‌های کامپوزیتی تولید شده از ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز استفاده از تکنیک اتصالات عرضی چندان مفید فایده نمی باشد و برای بهبود ویژگی‌های کامپوزیت ژلاتین-کربوکسی متیل سلولز تولید شده نانوسلولز به‌طور موثر تری عمل کرده است و استفاده از آن بدین منظور نسبت به اتصال عرضی ارجحیت دارد (Nur Hazirah et al., 2016; Mu et al., 2012).

استفاده همزمان از دو بیوپلیمر در تحقیق حاضر باعث بهبود استحکام کشش نهایی و ازدیاد طول در نقطه شکست کامپوزیت‌های تولید شده گردیده است استفاده از بیوپلیمرهای که از نظر ساختاری شبیه هم باشند باعث بهبود ویژگی‌های مکانیکی می‌شود (Averous et al., 2001). مقادیر به‌دست آمده برای استحکام کششی نانوکامپوزیت‌های ژلاتین-کربوکسی متیل سلولز در تحقیق حاضر چندین برابر مقدار استحکام کششی پلی اتیلن با دانسیته بالا (۲۳-۲۲ مگاپاسکال) است.

رنگ

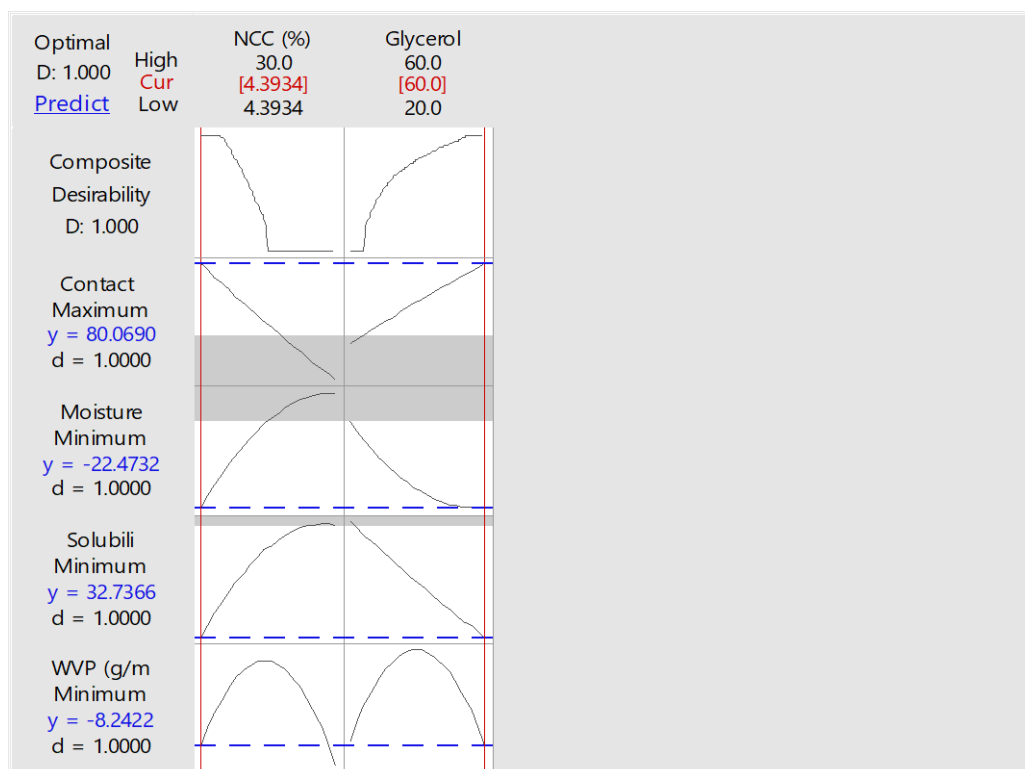
هرچه شفافیت فیلم‌های زیست پلیمری بیشتر و به پلاستیک‌های حاصل از پلیمرهای سنتزی نزدیکتر باشد، پذیرش و استفاده از این نوع مواد بسته بندی افزایش می‌یابد. ΔE در واقع درجه اختلاف رنگی نمونه‌ها با صفحه استاندارد را نشان می‌دهد هرچه ΔE برای یک نمونه کمتر باشد، نشان می‌دهد، آن فیلم شفاف‌تر است (Abolghasemi

بهینه‌سازی فرایند

همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است فرایند بهینه‌سازی برای ویژگی‌های اندازه گیری شده توسط نرم‌افزار Minitab18 صورت پذیرفت. هدف بهینه‌سازی تعیین مقادیر مطلوب متغیرهای مستقل آزمایش بود به نحوی که حداقل مقدار ممکن برای هر یک کدام از متغیرهای وابسته یعنی نفوذپذیری نسبت به بخار آب، حلالیت و جذب رطوبت و از طرف دیگر حداکثر مقدار ممکن برای ویژگی زاویه تماس آب به‌دست آید. بر اساس نتایج به‌دست آمده برای دستیابی به اهداف

۲۲/۴۷ درصد جذب رطوبت ۱۰-۱۲×۸/۲۴، حلالیت ۳۲/۷۴ درصد، مقدار جذب رطوبت ۸۰/۰۷ درصد و زاویه تماس قطره آب با سطح نانوکامپوزیت برابر با ۸۰/۰۷ درجه خواهد بود.

مورد نظر نانوکامپوزیت بایستی حاوی ۶۰/۰ درصد گلیسرول و ۴/۴۰ درصد نانوکریستال سلولز تولید شود در این صورت بر اساس پیش‌بینی نرم افزار مقدار نفوذپذیری نسبت به بخار آب $\text{gm/m}^2\text{Pas}$



شکل ۵- نمودار بهینه‌سازی و راهکار به دست آمده در خصوص ویژگی‌های نفوذپذیری نسبت به بخار آب، حلالیت در آب، جذب رطوبت و زاویه تماس

Fig. 5. The optimization process and the obtained solution due to the permeability to water vapor, solubility in water, moisture absorption and contact angle parameters.

رطوبت طبقه‌بندی می‌شوند که کاربرد آنها را برای مواد غذایی مرطوب مشکل می‌سازد. استفاده از کربوکسی متیل سلولز می‌تواند باعث بهبود خواص نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم‌های ژلاتین خالص شود همین‌طور استفاده از ژلاتین سبب افزایش زاویه تماس قطره آب با سطح فیلم‌های کربوکسی متیل سلولز خالص می‌شود. بر اساس مدل سازی انجام یافته توسط نرم‌افزار افزودن ۶۰ درصد گلیسرول و ۴/۴ درصد نانوسلولز به کامپوزیت‌های ژلاتین کربوکسی متیل سلولز سبب تولید فیلم مطلوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

فیلم‌های تولید شده از ژلاتین و کربوکسی متیل سلولز استحکام کششی زیادی از خود نشان دادند گرچه میزان ازدیاد طول در نقطه شکست آنها مطلوب نمی‌باشد ولی از نظر خواص مانعیتی در مقابل نفوذپذیری بخار آب از میان فیلم نیز در مقایسه با دیگر فیلم‌های تولید شده بر پایه بیوپلیمرهای طبیعی مقادیر بهبود یافته‌ای از خود نشان دادند از طرف دیگر از نظر خواص آبدوستی جزء فیلم‌های حساس به

منابع

1. Abolghasemi Fakhri, L., Ghanbarzadeh, B., Dehghannia, J. Entezami, A.A. (2012). The effects of montmorillonite and cellulose nanocrystals on physical properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blend films. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology* (In Persian), 24 (6), 456-465.
2. Almasi, H., Ghanbarzadeh, B., Pezeshki Najafabadi, A. 2010. Improving the physical properties of starch and starch – carboxymethyl cellulose composite biodegradable films. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, (In Persian), 6 (3), 1-11.
3. Almasi, H., Ghanbarzadeh, B., Dehghannia, J., Entezami, A., & Khosrowshahi Asl, A. (2015). Novel

- nanocomposites based on fatty acid modified cellulose nanofibers/poly(lactic acid): Morphological and physical properties. *Food Packaging and Shelf Life*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.04.003>
4. Angles, M. N., & Dufresne, A. (2001). Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposite materials. 2. Mechanical behavior. *Macromolecules*, 34(9), 2921-2931.
5. AOAC. (1995). Official Methods of Analysis, sixteenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington VA, USA.
6. Asgar, M. A., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., & Karim, A. (2010). Nonmeat Protein Alternatives as Meat Extenders and Meat Analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 513-529. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00124.x>
7. ASTM. (1995a). Annual Book of ASTM Standards. Standard test methods for water vapor transmission of materials (Vol. Designation E 96-95). Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
8. ASTM. (1995b). Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. D882-10 annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
9. Avérous, L., Fringant, C., & Moro, L. (2001). Plasticized starch-cellulose interactions in polysaccharide composites. *Polymer*, 42, 6565-6572. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00125-2)
10. Ayranci, E., & Tunc, S. (2001). The effect of fatty acid content on water vapour and carbon dioxide transmissions of cellulose-based films. *Food Chemistry*, 72, 231-236. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00227-2)
11. Ayranci, E., & Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423-431. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00485-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00485-5)
12. Boun, H. R., & Huxsoll, C. C. (1991). Control of Minimally Processed Carrot (*Daucus carota*) SurBOUN, H. R., & HUXSOLL, C. C. (1991). Control of Minimally Processed Carrot (*Daucus carota*) Surface Discoloration Caused by Abrasion Peeling. *Journal of Food Science*, 56(2), 416-418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05293.x>
13. Bower, C. K., Avena-Bustillos, R., Olsen, C. W., Mchugh, T., & Bechtel, P. (2006). Characterization of Fish-Skin Gelatin Gels and Films Containing the Antimicrobial Enzyme Lysozyme. *Journal of Food Science*, 71. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00031.x>
14. Chambi Mamani, H. N., & Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.09.009>
15. Cheng, L.-H., Karim, A., & Seow, C. C. (2008). Characterisation of composite films made of konjac glucomannan (KGM), carboxymethyl cellulose (CMC) and lipid. *Food Chemistry*, 107, 411-418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.068>
16. Cherian, B., Leao, A., Souza, S., Costa, L. M., Molina de Olyveira, G., Samy, K., Nagarajan, E. R., & Thomas, S. (2011). Cellulose nanocomposites with nanofibres isolated from pineapple leaf fibers for medical applications. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1790-1798. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.009>
17. Choi, Y., & Simonsen, J. (2006). Cellulose Nanocrystal-Filled Carboxymethyl Cellulose Nanocomposites. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(3), 633-639. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.132>
18. Cole, M., & Bergeson, L. (2007). Regulation of new forms of food packaging produced using nanotechnology. In *Intelligent and Active Packaging for Fruits and Vegetables* (pp. 289-306). <https://doi.org/10.1201/9781420008678.ch15>
19. Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K., Khakpour, M., & Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 606-613. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.09.006>
20. de Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2004). Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*, 18(5), 717-726. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.005>
21. Du, C. J., & Sun, D. W. (2004). Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), 230-249. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2003.10.006>
22. Ejaz, M., Arfat, Y. A., Mulla, M., & Ahmed, J. (2018). Zinc oxide nanorods/clove essential oil incorporated Type B gelatin composite films and its applicability for shrimp packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 15, 113-121. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2017.12.004>
23. Espitia, P. J. P., Du, W. X., de Jesús Avena-Bustillos, R., Soares, N. D. F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties-A review. *Food hydrocolloids*, 35, 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.005>
24. Farahnaky, A., Dadfar, S. M. M., & Shahbazi, M. (2014). Physical and mechanical properties of gelatin-clay

- nanocomposite. *Journal of Food Engineering*, 122, 78–83. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.06.016>
25. Farris, S., Schaich, K., Liu, L., Cooke, P., Piergiovanni, L., & Yam, K. (2011). Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.006>
26. Gennadios, A., Weller, C. L., Hanna, M. A., & Froning, G. W. (1996). Mechanical and barrier properties of egg albumen films. *Journal of Food Science*, 61(3), 585–589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb13164.x>
27. Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., & Entezami, A. A. (2010). Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 697–702. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2010.06.001>
28. Gomez-Guillen, M., Ihl, M., Bifani, V., Silva Weiss, A. C., & Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae Turcz*). *Food Hydrocolloids*, 21, 1133–1143. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.08.006>
29. Guerrero, P., Stefani, P. M., Ruseckaite, R. A., & de la Caba, K. (2011). Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2011.02.003>
30. Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films. *Technology and Application of Edible Protective Films*, 371–393.
31. Habibi, Y., & Dufresne, A. (2008). Highly Filled Bionanocomposites from Functionalised Polysaccharide Nanocrystals. *Biomacromolecules*, 9, 1974–1980. <https://doi.org/10.1021/bm8001717>
32. Jordan, J., Jacob, K. I., Tannenbaum, R., Sharaf, M. A., & Jasiuk, I. (2005). Experimental trends in polymer nanocomposites—a review. *Materials Science and Engineering: A*, 393(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.MSEA.2004.09.044>
33. Kaushik, A., Singh, M., & Verma, G. (2010). Green nanocomposites based on thermoplastic starch and steam exploded cellulose nanofibrils from wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 82, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.063>
34. Kawasumi, M. (2004). The discovery of polymer-clay hybrids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 819–824. <https://doi.org/10.1002/pola.10961>
35. Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
36. Kristo, E., & Biliaderis, C. (2007). Physical properties of starch nanocrystal reinforced pullulan film. *Carbohydrate Polymers*, 68, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.07.021>
37. León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084–1091. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2006.03.006>
38. Lim, G.-O., Jang, S.-A., & Song, K. (2010). Physical and antimicrobial properties of *Gelidium corneum*/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract or thymol. *Journal of Food Engineering*, 98, 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.021>
39. Morais, J. P. S., Rosa, M. de F., de Souza Filho, M. de S. M., Nascimento, L. D., do Nascimento, D. M., & Cassales, A. R. (2013). Extraction and characterization of nanocellulose structures from raw cotton linter. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 229–235. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.08.010>
40. Mu, C., Guo, J., Li, X., Lin, W., & Li, D. (2012). Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.09.005>
41. Nur Hazirah, M. A. S. P., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2016). Effect of xanthan gum on the physical and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose film blends. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2016.05.008>
42. Park, H. J., Weller, C. L., Vergano, P. J., & Testin, R. F. (1993). Permeability and Mechanical Properties of Cellulose-Based Edible Films. *Journal of Food Science*, 58(6), 1361–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06183.x>
43. Patil, B., Bharath Kumar, B. R., Bontha, S., Balla, V. K., Powar, S., Hemanth Kumar, V., Suresha, S. N., & Doddamani, M. (2019). Eco-friendly lightweight filament synthesis and mechanical characterization of additively manufactured closed cell foams. *Composites Science and Technology*, 183, 107816. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2019.107816>
44. Quilaqueo Gutiérrez, M., Echeverría, I., Ihl, M., Bifani, V., & Mauri, A. N. (2012). Carboxymethylcellulose-montmorillonite nanocomposite films activated with murta (*Ugni molinae Turcz*) leaves extract. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.040>
45. Reddy, J. P., & Rhim, J. W. (2014). Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. *Carbohydrate Polymers*, 110, 480–488. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.04.056>
46. Rhim, J. W., Wang, L. F., & Hong, S. I. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles

- composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 327–335. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2013.04.002>
47. Romero-Bastida, C. A., Bello-Pérez, L. A., García, M. A., Martino, M. N., Solorza-Feria, J., & Zaritzky, N. E. (2005). Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2005.01.004>
48. Rouhi, J., Mahmud, S., Naderi, N., Ooi, C. H. R., & Mahmood, M. R. (2013). Physical properties of fish gelatin-based bio-nanocomposite films incorporated with ZnO nanorods. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 364. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-364>
49. Sahraee, S., Milani, J. M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2017a). Effect of corn oil on physical, thermal, and antifungal properties of gelatin-based nanocomposite films containing nano chitin. *LWT- Food Science and Technology*, 76, 33–39. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.10.028>
50. Sahraee, S., Milani, J. M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2017b). Physicochemical and antifungal properties of bio-nanocomposite film based on gelatin-chitin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 373–381. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.12.066>
51. Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10), 786–794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>
52. Sekhon, B. (2010). Food nanotechnology—An overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, 3, 1–15. <https://doi.org/10.2147/NSA.S8677>
53. Shankar, S., Teng, X., Li, G., & Rhim, J.-W. (2015). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of gelatin/ZnO nanocomposite films. *Food Hydrocolloids*, 45, 264–271. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.12.001>
54. Silva, M., Bierhalz, A., & Kieckbusch, T. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77, 736–742. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.014>
55. Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A. B., & Ståhl, K. (2005). On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. *Cellulose*, 12(6), 563–576. <https://doi.org/10.1007/s10570-005-9001-8>
56. Tong, Q., Xiao, Q., & Lim, L.-T. (2008). Preparation and properties of pullulan–alginate–carboxymethylcellulose blend films. *Food Research International*, 41(10), 1007–1014. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2008.08.005>
57. Turhan, K. N., & Şahbaz, F. (2004). Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, 61(3), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00155-9)
58. Turhan, K., Sahbaz, F., & Güner, A. (2001). A Spectrophotometric Study of Hydrogen Bonding in Methylcellulose-based Edible Films Plasticized by Polyethylene Glycol. *Journal of Food Science*, 66, 59–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15581.x>
59. Xiaodong Cao, Hua Dong, and, & Li, C. M. (2007). New Nanocomposite Materials Reinforced with Flax Cellulose Nanocrystals in Waterborne Polyurethane. <https://doi.org/10.1021/BM0610368>
60. Zahed Karkaj, S., Peighambaroust, S. J. (2018). Physical, mechanical and antibacterial properties of nanobiocomposite films based on carboxymethyl cellulose/nanoclay. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology* (In Persian) 30 (6), 557-572.



Evaluation of total phenols and flavonoids, antioxidant power, and antimicrobial activity of *Levisticum officinale* Koch essential oil against some spoilage fungi causing apple and orange rot

Mostafa, Rahmati-Joneidabad^{1*}, Behrooz Alizadeh Behbahani², Mohammad Noshad³

Received: 2022.01.14

Revised: 2022.01.20

Accepted: 2022.01.25

Available Online: 2022.01.25

How to cite this article:

Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. (2022). Evaluation of total phenols and flavonoids, antioxidant power, and antimicrobial activity of *Levisticum officinale* Koch essential oil against some spoilage fungi causing apple and orange rot. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 699-709.

Abstract

Introduction: Economic losses can occur due to the growth of fungi on foods that lead to food spoilage and plant diseases. Fruits and vegetables are often exposed to microbial activity, caused by pathogenic fungi, during post-harvest storage. Diseases of food origin are a growing public health problem. Thus, food safety has become a major public concern as microbial contamination increases the risk of foodborne illnesses and shortens the shelf life of foods. Infection with fungi such as *Aspergillus*, *Rhizopus*, and *Penicillium* species is considered as the primary cause of rapid spoilage of fresh produce, which reduces their quality and shelf life. Synthetic fungicides have been applied to solve this problem for many years. Nonetheless, the adverse effects of synthetic chemicals on human health and the emergence of fungicide-resistant strains have motivated the scientists and food industries to find out safe preservatives to control postharvest rot/diseases. On this point, natural antimicrobial agents such as plant extracts and essential oils are gaining more and more interest. In this study, we used *Levisticum officinale* Koch essential oil, which its antimicrobial and antioxidant activity has been reported in literatures.

Materials and Methods: *L. officinale* Koch essential oil was obtained by hydrodistillation method and its total phenol content, total flavonoids, antioxidant activity (based on DPPH and ABTS free radical scavenging and β -carotene bleaching tests) and its antifungal effect against fungi causing apple and orange rotting (*Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea*) were examined according to antimicrobial tests of disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum fungicidal concentration.

Results and Discussion: *L. officinale* Koch essential oil contained 61.27 ± 0.34 mg GAE/g and 20.14 ± 0.21 mg QE/g total phenol and flavonoids, respectively. Its antioxidant activity, based on DPPH free radical scavenging, ABTS free radical scavenging, and β -carotene bleaching inhibition were $69.72 \pm 0.65\%$, $78.54 \pm 0.3\%$ and $57.50 \pm 0.41\%$, respectively. *L. officinale* Koch essential oil was effective against all fungal species and the highest susceptibility was observed for *Penicillium expansum*. According to the results, *L. officinale* Koch essential oil can be used as a natural antifungal agent to prevent post-harvest diseases of fruits and vegetables.

1. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, 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. 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: Rahmati@asnrukh.ac.ir)

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2022.74735.1136](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.74735.1136)

Keywords: *Levisticum officinale* Koch; Essential oil; Antioxidant effect; Antifungal effect; Natural preservative.

مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی فنول و فلاونوئید کل، قدرت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی اسانس انجدان رومی بر برخی از قارچ‌های عامل پوسیدگی و فساد میوه سیب و پرتقال

مصطفی رحمتی جنیدآباد^{۱*} - بهروز عزیزاده بهبهانی^۲ - محمد نوشاد^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵

چکیده

در این مطالعه، اسانس انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch) توسط روش تقطیر با آب استخراج شد و سپس محتوای فنول تام، فلاونوئید تام، فعالیت آنتی اکسیدانی (بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH، رادیکال آزاد ABTS و زوال رنگ بتا-کاروتن) و اثر ضدقارچی آن علیه قارچ‌های عامل پوسیدگی و فساد سیب و پرتقال (*آلترناریا آلترناتا*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم*، *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم*، *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* و *بوتریتیس سینه‌را*) مطابق آزمون‌های ضد میکروبی دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت. اسانس انجدان رومی به ترتیب حاوی ۰/۳۴ mg GAE/g و ۶۱/۲۷ ± ۲۰/۱۴۴ mg QE/g فنول و فلاونوئید تام بود. فعالیت آنتی اکسیدانی آن بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH، رادیکال آزاد ABTS و زوال رنگ بتا-کاروتن به ترتیب ۶۹/۷۲ ± ۰/۶۵ درصد، ۷۸/۵۴ ± ۰/۳ درصد و ۵۷/۵۰ ± ۰/۴۱ درصد بود. اسانس انجدان رومی در برابر تمامی گونه‌های قارچی تأثیرگذار بود و بیشترین حساسیت در مورد قارچ *پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم* مشاهده شد. مطابق نتایج، اسانس انجدان رومی را می‌توان به عنوان ضدقارچ طبیعی جهت جلوگیری از پوسیدگی و فساد میوه‌ها و سبزیجات پس از برداشت استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: انجدان رومی، اسانس، فعالیت آنتی اکسیدانی، اثر ضدقارچی، نگهدارنده طبیعی.

مقدمه

غذایی را همراه با اسانس‌های خوراکی مورد استفاده برای طعم‌دهی فراهم می‌کنند (Rossi and Palacios, 2013). با این حال، مرکبات به دلیل رطوبت بالا و ترکیب مواد مغذی، مستعد حمله توسط قارچ‌هایی هستند که باعث ایجاد بیماری‌هایی مانند پوسیدگی انتهای ساقه، کپک آبی و کپک سبز و از دست دادن طعم در طول ذخیره‌سازی پس از برداشت می‌شوند (Chien and Chou, 2006).

بیماری‌های با منشأ غذایی یک مشکل رو به رشد بهداشت عمومی در سراسر جهان به‌شمار می‌رود. بنابراین، ایمنی مواد غذایی به یک نگرانی عمومی مهم تبدیل شده است، زیرا آلودگی میکروبی نه تنها خطر ابتلا به بیماری‌های با منشأ غذا را افزایش می‌دهد، بلکه عمر مفید مواد غذایی را نیز کاهش می‌دهد (Ghadimi et al., 2016; Pires et al., 2021). آلودگی به قارچ‌هایی مانند گونه‌های ریزوپوس،

زیان‌های اقتصادی می‌تواند به دلیل رشد قارچ‌ها روی مواد خوراکی که منجر به فساد مواد غذایی و بیماری‌های گیاهی شود، رخ دهد. در کشاورزی، در طول ذخیره‌سازی پس از برداشت، میوه‌ها و سبزیجات اغلب در معرض فعالیت میکروبی می‌باشند که توسط قارچ‌های بیماری‌زا ایجاد می‌شود (Vehapi et al., 2020). میوه سیب با ۳/۵ میلیون تن تولید سالیانه، رتبه اول تولید را در بین محصولات باغی دارد. با این حال، این میوه پس از برداشت به پوسیدگی قارچی توسط جنس‌های *آلترناریا*، *پنی‌سیلیوم* و *بوتریتیس* بسیار حساس است (Nikkhah et al., 2019). مرکبات، بعنوان بخشی از رژیم غذایی انسان، مواد مغذی مختلفی از جمله ویتامین ث، اسید فولیک، پتاسیم، فلاونوئیدها، پکتین و فیبر

^۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

* نویسنده مسئول: Email: Rahmati@asnruk.ac.ir

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74735.1136

^۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

^۲ و ^۳ - به ترتیب استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

آب توسط دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت انجام گردید. در نهایت، اسانس توسط سولفات سدیم بدون آب خشک و سپس در ویال‌های تیره در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Miran et al., 2018a).

اندازه‌گیری فنول تام

محتوای فنول کل اسانس مطابق روش Barzegar و همکاران (۲۰۲۰)، اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس (۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یا اسید گالیک (۰/۵ تا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو (۱۰ درصد حجمی بر میلی‌لیتر) ترکیب گردید و سپس ۰/۳ میلی‌لیتر کرینات سدیم (۱۰ درصد وزنی/حجمی) به محلول اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در طول موج ۷۵۶ نانومتر ثبت شد. محتوای فنول اسانس در نهایت به صورت میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم اسانس (mg GAE/g) بیان شد (Barzegar et al., 2020).

اندازه‌گیری فلاونوئید تام

محتوای فلاونوئید کل اسانس بر اساس روش Noshad و همکاران (۲۰۲۱)، اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول نیتريت سدیم ترکیب و مخلوط به مدت ۱۰ ثانیه همزده شد. پس از نگهداری به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، محلول آلومینیوم کلراید، هیدروکسید سدیم و آب مقطر به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه همزده شد. جذب مخلوط در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید و محتوای فلاونوئید کل به صورت میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم از اسانس (mg QE/g) بیان شد (Noshad et al., 2021).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس مطابق روش‌های مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و زوال رنگ بتا-کاروتن/لینولئیک اسید بررسی گردید. فعالیت مهار رادیکال DPPH بر اساس روش ارائه شده توسط Yeganegi و همکاران (۲۰۱۸)، اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، اسانس گیاه در متانول حل شد تا غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آید. سپس ۱ میلی‌لیتر از اسانس با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی رادیکال DPPH (۰/۲ میلی‌مولار) مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و در مکان تاریک، جذب محلول در طول موج

آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم عامل اصلی فساد سریع محصولات تازه است که بر کیفیت آن‌ها تأثیر می‌گذارد و ماندگاری آن‌ها را کوتاه می‌کند. سال‌هاست که از قارچ‌کش‌های مصنوعی برای حل این مشکل استفاده می‌شود. با این حال، ارتباط مواد شیمیایی مصنوعی با اثرات نامطلوب بر سلامت انسان و توسعه سویه‌های مقاوم به قارچ‌کش، جستجو برای استراتژی‌های جدید به‌منظور کنترل پوسیدگی پس از برداشت را سبب شده است. در سال‌های اخیر، بسیاری از پژوهشگران بر جستجوی عوامل ضد میکروبی طبیعی تمرکز کرده‌اند و عصاره‌های گیاهی و اسانس‌ها اهمیت بیشتری پیدا می‌کنند (Tejeswini et al., 2014).

در میان چندین گونه از گیاهان معطر مورد استفاده در آشپزی، انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch) زمانی بسیار شناخته شده بود و به‌طور قابل‌توجهی به‌عنوان ادویه در سوپ‌ها، خورش‌ها، غذاهای گوشتی و غیره استفاده می‌شد. انجدان رومی یک گیاه بومی جنوب غربی آسیا و جنوب اروپا است که به‌عنوان یک گیاه دولپه‌ای چند ساله از خانواده چتریان (*Apiaceae*) طبقه‌بندی شده و عمدتاً به دلیل خواص معطر آن استفاده می‌شود (Spréa et al., 2020). اسانس انجدان رومی در صنایع نوشیدنی، غذایی، عطر و تنباکو مورد استفاده قرار گرفته است. ترکیب شیمیایی اسانس انجدان رومی شامل لیگوستیلید، پنتیل سیکلوهاگزان، مشتقات فتالید و ترپنوئیدها از جمله آلفا و بتا-پینن، آلفا و بتا-فلاندرن، گاما-ترپینن، کارواکرول، اوژنول و آلفا-ترپینول می‌باشد (Miran et al., 2018b). علاوه بر این، فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس انجدان رومی در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است (Chaudhari et al., 2021; Jakubczyk et al., 2020; Miran et al., 2018a). در این پژوهش، محتوای فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدقارچی اسانس انجدان رومی در برابر قارچ‌های عامل پوسیدگی و فساد میوه سیب و پرتقال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از معرف فولین-سیوکالتو، لینولئیک اسید، بتا-کاروتن، رادیکال آزاد ABTS^۱، رادیکال آزاد DPPH^۲ (سیگما، آمریکا) و محیط‌های کشت سابروز دکستروز براث و سابروز دکستروز آگار (مرک، آلمان) استفاده گردید.

استخراج اسانس انجدان رومی

اندام‌های هوایی گیاه جمع‌آوری شده (۱۵۰ گرم) توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر گردید و سپس اسانس‌گیری با کمک روش تقطیر با

سابروز دکستروز آگار استریل قرار داده شدند. لازم به ذکر است که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از هر سویه قارچی روی محیط سابروز دکستروز آگار کشت داده شدند. پلیتهای حاوی سویه قارچی و دیسک به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردید و سپس قطر هاله‌های عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) به عنوان مناطق مهارکننده گزارش شد (Rahmati-Joneidabad and Alizadeh Behbahani, 2012; 2021).

انتشار چاهک در آگار: در این روش، ۲۰ میکرولیتر از اسانس استریل به چاهک‌هایی که روی سطح محیط سابروز دکستروز آگار ایجاد شده بودند و از قبل با سویه‌های قارچی بارگذاری شده بود، اضافه گردید. محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید و سپس قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Rahmati-Joneidabad and Alizadeh Behbahani, 2021).

حداقل غلظت مهارکنندگی: در این روش، ۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس (۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در لوله‌های آزمایش اضافه گردید. لوله‌های آزمایش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و رشد سویه‌های قارچی توسط کدورت ایجاد شده با چشم مشاهده شد و لوله بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (Rahmati-Joneidabad and Alizadeh Behbahani, 2021).

حداقل غلظت کشندگی: برای انجام این آزمون، از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورتی مشاهده نشده بود، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت برداشته شد و روی سطح محیط کشت سابروز دکستروز آگار کشت داده شد. گرمخانه‌گذاری مطابق روش بالا تکرار گردید و در نهایت حداقل غلظتی که سبب جلوگیری از رشد سویه‌ها گردید، به عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس گزارش شد (Rahmati-Joneidabad and Alizadeh Behbahani, 2013; 2021).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p < 0.05$) آنالیز شدند. لازم به ذکر است که آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. توانایی مهار رادیکال با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Yeganegi et al., 2018):

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{sample}}] \times 100 \quad (1)$$

روش Alizadeh Behbahani و همکاران (۲۰۱۹)، برای ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS اسانس مورد استفاده قرار گرفت. کاتیون‌های ABTS ابتدا با واکنش حجم‌های یکسان محلول ABTS (۷ میلی‌مولار) و پرسولفات پتاسیم (۲/۴۵ میلی‌مولار) و پس از نگهداری محلول به‌دست‌آمده در دمای اتاق، در شرایط تاریک به مدت ۱۶ ساعت، تولید شدند. سپس محلول ABTS با متانول تا رسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق گردید. پس از آن، ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده رادیکالی ABTS با ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس یا متانول (به عنوان نمونه شاهد) مخلوط شد. محلول به مدت ۶ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS اسانس بر اساس رابطه زیر محاسبه شد (Alizadeh Behbahani et al., 2019):

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{sample}}] \times 100 \quad (2)$$

اثر بازدارندگی اسانس در برابر زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئات از طریق روش اسپکتروفتومتری (در ۴۹۰ نانومتر) و مطابق روش Dapkevicius و همکاران (۱۹۹۸) بررسی گردید:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(AA_{(120)} - AC_{(120)}) / (AC_{(0)} - AC_{(120)})] \times 100 \quad (3)$$

در این رابطه، $AA_{(120)}$ جذب نمونه پس از زمان گرمخانه‌گذاری ۱۲۰ دقیقه، $AC_{(0)}$ و $AC_{(120)}$ به ترتیب جذب نمونه کنترل در زمان صفر و پس از ۱۲۰ دقیقه زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشند (Dapkevicius et al., 1998).

فعالیت ضدقارچی

فعالیت ضدقارچی اسانس انجدان رومی در برابر سویه‌های میکروبی *آلترناریا آلترناتا*^۱، *پنی‌سیلیوم اکسپانسم*^۲، *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم*^۳، *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم*^۴ و *بوتریتیس سینه‌را*^۵ بر اساس روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، انتشار چاهک در آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی ارزیابی گردید.

دیسک دیفیوژن آگار: ابتدا دیسک‌های استریل به مدت ۱۵ دقیقه در اسانس گیاه (استریل شده توسط فیلتر غشایی با قطر ۰/۲۲ میکرون) غوطه‌ور شدند. سپس دیسک‌های استریل روی سطح محیط کشت

4 *Penicillium italicum*

5 *Botrytis cinerea*

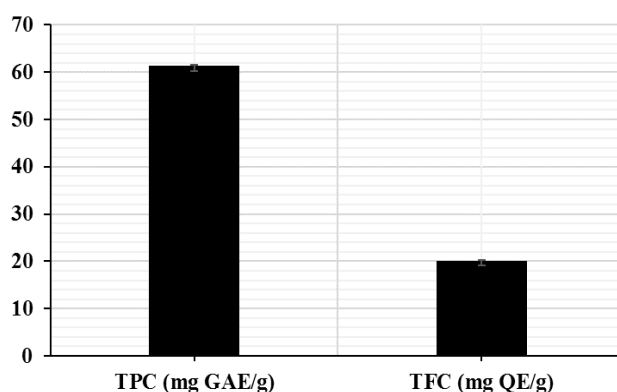
1 *Alternaria alternata*

2 *Penicillium expansum*

3 *Penicillium digitatum*

نتایج و بحث

ترکیبات فنولی نقش بسیار مهمی در ظرفیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس و عصاره های گیاهی ایفا می کنند. اسانس انجدان رومی به ترتیب حاوی 0.34 ± 0.61 mg GAE/g و 0.21 ± 0.61 mg QE/g (شکل ۱) و همکاران (۲۰۲۱)، نشان داد که عصاره متانولی انجدان رومی حاوی 52.01 ± 0.1 mg GAE/g فنول تام می باشد (Kozłowska et al., 2021). در مطالعه دیگر مشخص گردید که عصاره آبی انجدان رومی دارای 118 mg/g فنول تام و 93 mg/g فلاونوئید تام می باشد، در حالی که عصاره اتانولی این گیاه حاوی 233 mg/g فنول تام و 163 mg/g فلاونوئید تام بود



شکل ۱- محتوای فنول کل (TPC) و فلاونوئید کل (TFC) اسانس انجدان رومی.

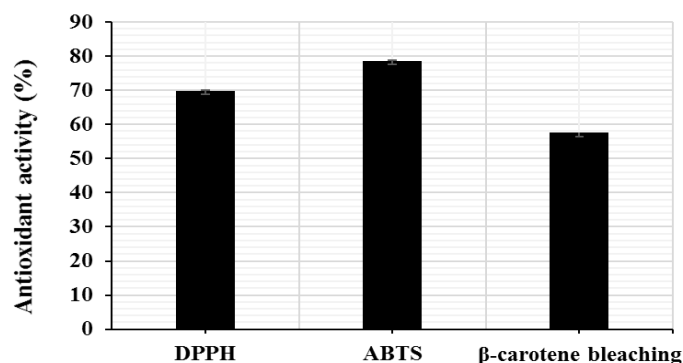
Fig. 1. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of *Levisticum officinale* Koch essential oil.

ایجاد می کند. رنگ سبز- آبی محلول $ABTS^{•+}$ در حضور آنتی اکسیدان ها رنگ زدایی می شود و شدت رنگ زدایی (احیاء) به روش اسپکتروفتومتری با نظارت بر کاهش جذب آن در طول موج 734 نانومتر ارزیابی می شود (Nooshkam et al., 2019). مطابق نتایج، فعالیت اسانس در مهار رادیکال های آزاد $ABTS$ بسیار بالا بود ($0.3 \pm 0.54/78$ درصد).

حذف اتم هیدروژن از گروه متیلن دی الیلک اسید لینولئیک منجر به تشکیل رادیکال های آزاد می شود که به نوبه خود به مولکول بتا- کاروتن حمله کرده و تغییر رنگ سریع به دنبال آن رخ می دهد. سرعت رنگبری بتا کاروتن در حضور آنتی اکسیدان ها کاهش می یابد که قادر به خنثی سازی رادیکال های آزاد تولید شده در طی واکنش می باشند (Rahmati-Joneidabad and Alizadeh Behbahani, 2021). اسانس انجدان رومی توانست به طور قابل ملاحظه ای تغییر رنگ سریع بتا- کاروتن را مانع شود و قدرت مهار رادیکال مناسبی را نشان داد ($0.41 \pm 0.57/57$ درصد) که احتمالاً از طریق به دام انداختن و خنثی کردن رادیکال های آزاد لینولات می باشد. فعالیت آنتی اکسیدانی بالای

شکل ۲، نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس انجدان رومی بر پایه روش های مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد $ABTS$ و زوال رنگ بتا- کاروتن را نشان می دهد. رادیکال آلی نسبتاً پایدار DPPH به طور گسترده برای تعیین پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره/ اسانس های گیاهی و ترکیبات منفرد استفاده شده است (Alizadeh Behbahani and Shahidi, 2019; Falah et al., 2021). DPPH یک ترکیب شیمیایی با ساختار رادیکال- کروموفرن است. ترکیبات آنتی اکسیدانی رادیکال DPPH را به مولکول پایدار DPPH-H از طریق اهدای هیدروژن همراه با تغییر رنگ از بنفش به زرد، که می تواند به صورت اسپکتروفتومتری در طول موج 517 نانومتر بررسی شود، تبدیل می کند (Nooshkam et al., 2019). اسانس دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی در برابر رادیکال های آزاد DPPH بود ($0.65 \pm 0.69/72$ درصد). این بدان معنی است که اسانس انجدان رومی حاوی ترکیبات زیست فعال با توانایی خنثی کردن رادیکال های DPPH از طریق اهداء اتم های هیدروژن و الکترون است. روش آنتی اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال آزاد $ABTS$ مبتنی بر اکسیداسیون مستقیم $ABTS$ توسط پتاسیم پرسولفات است که یک کاتیون رادیکال آزاد پایدار ($ABTS^{•+}$)

مرتبط دانسته شد (Wojdyło et al., 2007). Athari و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه انجدان رومی وابسته به غلظت می باشد و افزایش غلظت عصاره از ۱۰۰ ppm به ۱۰۰۰ سبب افزایش ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH از ۱۹/۶۴ درصد به ۸۸/۵۹ درصد گردید. علاوه بر این، افزودن عصاره به روغن سویا به طور معنی داری سبب افزایش پایداری اکسایشی آن گردید (Athari et al., 2020). همچنین، گزارش شده است که عصاره اتانولی گیاه انجدان رومی، بدلیل محتوای ترکیبات فنولی بالاتر، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره آبی می باشد (Spréa et al., 2020).



شکل ۲- فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس انجدان رومی.

Fig. 2- Antioxidant activity of *Levisticum officinale* Koch essential oil.

ضدقارچی اسانس وابسته به غلظت می باشد (جدول ۱). تمامی سویه های قارچی در حضور غلظت پایین اسانس (۴ mg/ml) قادر به رشد بودند. به استثناء پنی سیلیوم/کپانسونم، سویه های قارچی درگیر قادر به رشد در غلظت ۵ mg/ml اسانس بودند. با اینحال، غلظت های بالاتر اسانس (> ۸ mg/ml) سبب جلوگیری از رشد سویه های قارچی گردید، به استثناء بوتریتیس سینه را که قادر به رشد در حضور غلظت ۱۶ mg/ml اسانس بود که بیانگر مقاومت بالای این سویه در برابر اسانس می باشد. نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی نیز نشان داد که پنی سیلیوم/کپانسونم در حضور غلظت کمتری از اسانس غیرفعال می گردد (شکل ۵).

فعالیت ضدباکتریایی اسانس انجدان رومی در مطالعات مختلف بررسی شده است (Miran et al., 2018a; Miran et al., 2018b). با این حال اطلاعات محدودی در مورد اثر ضدقارچی آن موجود می باشد. در مطالعه صورت گرفته توسط Shafaghat (۲۰۱۱)، فعالیت ضد میکروبی عصاره (هگزان) میوه و ریشه گیاه انجدان رومی در برابر ۳ قارچ (کاندیدا/آلبیکنس، آسپرژیلوس نایجر و ساکارومایسس سرویزیه) مطابق روش دیسک دیفیوژن آگار بررسی گردید و نتایج نشان داد که عصاره دارای اثر ضدقارچی در برابر سویه های کاندیدا/آلبیکنس و

اسانس انجدان رومی عمدتاً به دلیل ترکیبات پلی فنولی آن مانند اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها است.

Azizian Shermeh و همکاران (۲۰۱۸) با مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های آبی، متانولی و اتانولی گیاه انجدان رومی بر پایه روش مهار رادیکال آزاد DPPH نشان دادند که عصاره متانولی و آبی به ترتیب دارای بیشترین و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی می باشند و این اثر به محتوای فنول بالاتر عصاره متانولی نسبت داده شد (Azizian Shermeh et al., 2018). در مطالعه ای دیگر مشخص گردید که گیاه انجدان رومی توانایی نسبتاً خوبی در مهار رادیکال های آزاد DPPH دارد و قدرت آنتی اکسیدانی آن با مقادیر فلاونوئید و فنول

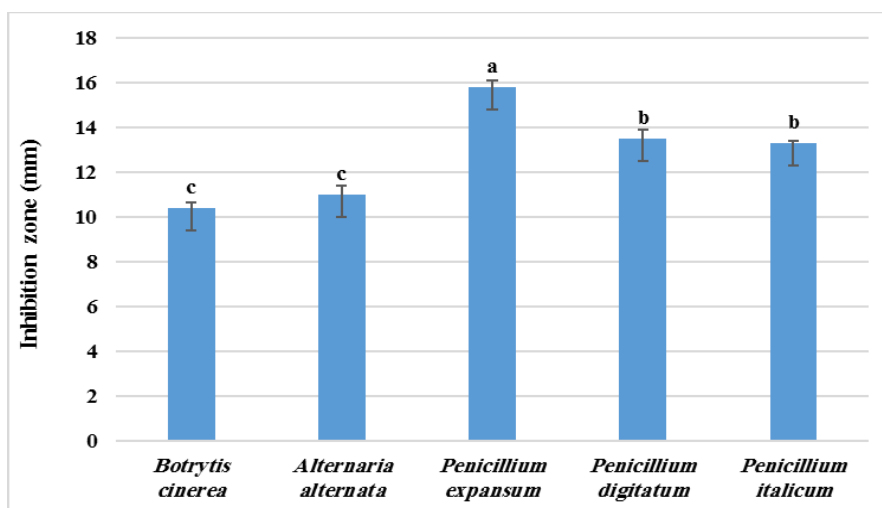
نتایج فعالیت ضدقارچی اسانس انجدان رومی در برابر قارچ های عامل پوسیدگی و فساد سبب و پرتقال در شکل های ۳، ۴ و ۵ و جدول ۱ ارائه شده است. اسانس انجدان رومی در برابر تمامی گونه های قارچی تأثیر گذار بود. مطابق نتایج آزمون دیسک دیفیوژن آگار (شکل ۳)، بالاترین قطر هاله عدم رشد در مورد قارچ پنی سیلیوم/کپانسونم مشاهده شد (حساس ترین سویه)، در حالیکه قارچ بوتریتیس سینه را کمترین قطر هاله عدم رشد را بخود اختصاص داد (مقاوم ترین سویه). همچنین، جنس های پنی سیلیوم نسبت به سایر قارچ ها از حساسیت بالاتری در برابر اسانس انجدان رومی برخوردار بودند.

نتایج آزمون چاهک آگار نیز مشابه روش دیسک دیفیوژن آگار بود (شکل ۴) و پنی سیلیوم/کپانسونم و بوتریتیس سینه به ترتیب حساس ترین و مقاوم ترین سویه ها نسبت به اسانس بودند. لازم به ذکر است که قطر هاله های عدم رشد در آزمون چاهک آگار بالاتر از دیسک دیفیوژن آگار بود. این حالت عمدتاً به دلیل تماس مستقیم اسانس و باکتری در آزمون چاهک آگار است؛ اما در آزمایش ضد میکروبی دیسک دیفیوژن آگار، اسانس باید از طریق دیسک ها در محیط کشت پخش شود تا اثر بازدارندگی خود را اعمال کند (Alizadeh Behbahani et al., 2019). نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی نشان داد که اثر

باشد که از طریق تخریب دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی، کاهش سیتوپلاسم اطراف هسته، مختل کردن عملکرد چربی غشاء پلاسمایی و در نتیجه تغییر نفوذپذیری و نشت ترکیبات درون سلولی، سبب جلوگیری از رشد سویه‌های میکروبی می‌شود (Ciocarlan et al., 2018). لازم به ذکر است که به علت ماهیت آبگریز، اسانس‌های گیاهی قادر به نفوذ در میسلیم قارچ و جلوگیری از رشد آن می‌باشند. با این حال، به دلیل حضور ترکیبات مختلف در اسانس‌های گیاهی، مکانیسم دقیقی در ارتباط با اثر ضدقارچی آن‌ها وجود ندارد؛ بنظر می‌رسد بعضی از این ترکیبات قادر به افزایش نفوذپذیری و تخریب غشاء و بعضی قادر به کاهش اندازه قارچ و اصلاح مورفولوژی سلولی می‌باشند (Rahmati-Joneidabad and Alizadeh Behbahani, 2021).

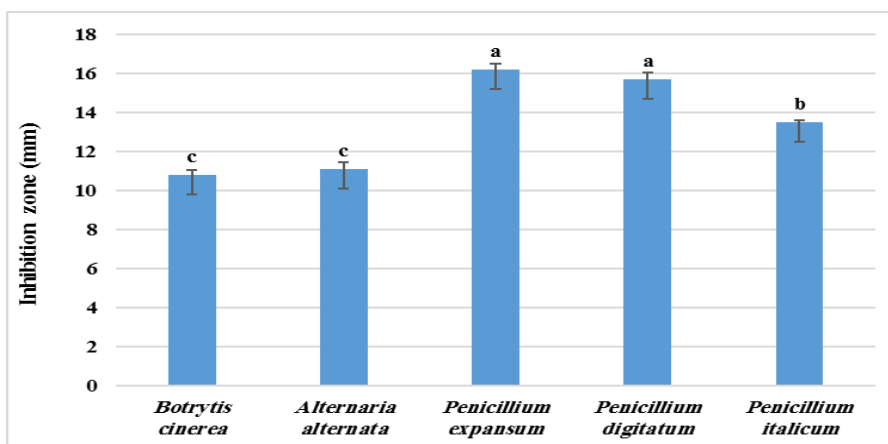
ساکارومایسس سرویزیه می‌باشد. این محققان اثر ضد میکروبی را به حضور اسیدهای چرب و ترکیبات ترپنوئیدی در عصاره نسبت دادند (Shafaghat, 2011). Chaudhari و همکاران (۲۰۲۱)، فعالیت ضدقارچی اسانس انجدان رومی را علیه رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفلاتوکسین بررسی نمودند. نتایج این محققین نشان داد که اسانس انجدان رومی قادر به جلوگیری از تولید ارگوسترول (استرول اصلی دیواره قارچ‌ها مسئول تنظیم سیالیت و یکپارچگی غشاء)، افزایش نشت یون‌های سلولی و تخریب نفوذپذیری غشاء می‌باشد که از این طریق سبب جلوگیری از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین می‌شود (Chaudhari et al., 2021).

علاوه بر این، Ciocarlan و همکاران (۲۰۱۸) بیان نمودند که اثر ضدقارچی اسانس انجدان رومی علیه *کاندیدا یوتیلیس* می‌تواند ناشی از حضور ترکیبات بتا-فلاندرن، آلفا-ترپنیل استات و لیگوستیلید در اسانس



شکل ۳- فعالیت ضد قارچی اسانس انجدان رومی بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار.

Fig. 3. Antifungal activity of *Levisticum officinale* Koch essential oil based on agar disk diffusion method.



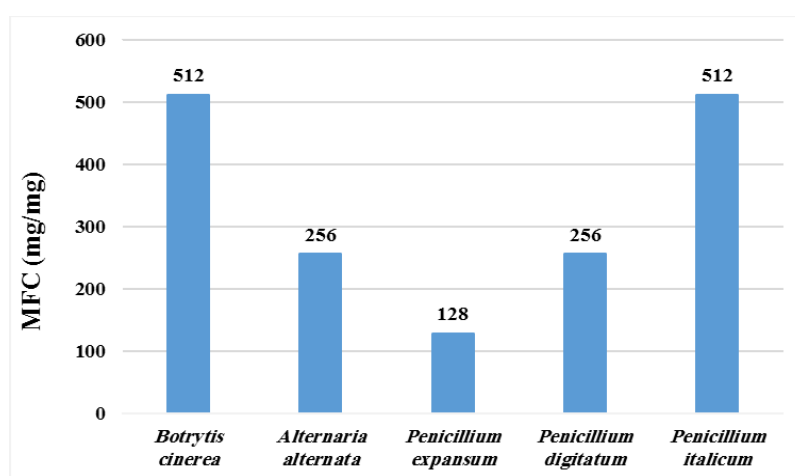
شکل ۴- فعالیت ضد قارچی اسانس انجدان رومی بر اساس روش چاهک آگار.

Fig. 4. Antifungal activity of *Levisticum officinale* Koch essential oil based on agar well diffusion method.

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) اسانس انجدان رومی به روش ماکرودایلوشن برات
Table 1- The results of minimum inhibitory concentration (MIC) of *Levisticum officinale* Koch essential oil by broth macrodilution method

<i>Levisticum officinale</i> Koch essential oil concentration (mg/ml)									
Control	512	256	128	64	32	16	8	4	Microorganism
-	-	-	-	-	-	+	+	+	<i>Botrytis cinerea</i>
-	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Alternaria alternata</i>
-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Penicillium expansum</i>
-	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Penicillium digitatum</i>
-	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Penicillium italicum</i>

Growth: (+) No growth: (-)



شکل ۵- فعالیت ضدقارچی اسانس انجدان رومی بر اساس روش حداقل غلظت کشندگی.

Fig. 5. Antifungal activity of *Levisticum officinale* Koch essential oil based on the minimum fungicidal concentration (MFC).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه انجدان رومی از اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی خوبی برخوردار است و با شناسایی نوع ترکیبات موثره این گیاه می توان مطالعات جامع تری در مورد اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن انجام داد. اسانس انجدان رومی قادر به مهار رادیکال های آزاد و جلوگیری از رشد قارچ های عامل فاسد و پوسیدگی سیب و پرتقال (*آلترناریا آلترناتا*، *پنی سیلیوم اکسپانسم*، *پنی سیلیوم دیجیتاتوم*، *پنی سیلیوم ایتالیکوم* و *بوتریتیس سینه را*) در شرایط برون تنی بود. بنابراین، اسانس این گیاه می تواند کاندید خوبی جهت

درمان بیماری های ناشی از استرس های اکسیداتیوی و جلوگیری از بیماری های پس از برداشت میوه ها و سبزیجات باشد. در تحقیقات آتی می توان اثرات سینرژیستی اسانس انجدان رومی را با نگهدارنده ها یا اسانس های دیگر گیاهان دارویی بررسی و مقایسه نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

- Alghooneh, A., Alizadeh Behbahani, B., Noorbakhsh, H., & Yazdi, F. T. (2015). Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter sausage containing *Satureja bachtiarica* extracts. *Microbial pathogenesis*, 85, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.06.003>

2. Alizadeh Behbahani, B., & Shahidi, F. (2019). Melissa officinalis essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutrition and Food Sciences Research*, 6(1), 17-25 . DOI: 10.29252/nfsr.6.1.17
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. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.
4. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M. (2013). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus" in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.
5. 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.
6. Athari, M., Elhami Rad, A .H., Nemat Shahi, M. M., & Nemat Shahi, N. (2020). Study of antioxidant properties of leaf extract of *Levyticum Officinale* and its effect on soybean oil stability in storage conditions. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 12(4), 192-179.
7. Azizian Shermeh, O., Taherizadeh, M., Valizadeh, M., & Qasemi, A. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities and determining phenolic and flavonoid contents of the extracts of five species from different families of the medicinal plants grown in Sistan and Baluchestan province. *Journal of Advanced Biomedical Sciences*, 7(4), 465-479 .
8. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*, 29(5), 717-728 . <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00715-4>
9. Chaudhari, A. K., Das, S., Singh, V. K., Prasad, J., & Dubey, N. K. (2021). Assessing the *Levisticum officinale* Koch. essential oil as a novel preservative for stored chia seeds (*Salvia hispanica* L.) with emphasis on probable mechanism of action. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14985-1>
10. Chien, P. J., & Chou, C. C. (2006). Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan Hayata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1964-1969. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2570>
11. Ciocarlan, A., Dragalin, I., Aricu, A., Lupascu, L., Ciocarlan, N., & Popescu, V. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of the *Levisticum officinale* WDJ Koch essential oil. *Chemistry Journal of Moldova*, 13(2), 63-68 .
12. Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A., & Linssen, J. P. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 140-146. <https://doi.org/10.19261/cjm.2018.514>
13. Falah, F., Shirani, K., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2021). In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of *Echinops setifer* extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102102. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102102>
14. Ghadimi, S., Heshmati, A., Shafa, M. A., & Nooshkam, M. (2016). Microbial quality and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Isolated from traditional ice cream in Hamadan city, West of Iran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 4(1), 39781-3978.
15. Jakubczyk, A., Złotek, U., Szymanowska, U., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Jęderka, K., & Lewicki, S. (2020). In vitro antioxidant, anti-inflammatory, anti-metabolic syndrome, antimicrobial, and anticancer effect of phenolic acids isolated from fresh Lovage Leaves [*Levisticum officinale* Koch] Elicited with Jasmonic Acid and Yeast Extract. *Antioxidants*, 9(6), 554. <https://doi.org/10.3390/antiox9060554>
16. Kiarsi, Z., Hojjati, M., Behbahani, B. A., & Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 40(3), 12782. <https://doi.org/10.1111/jfs.12782>
17. Kozłowska, M., Ścibisz, I., Przybył, J., Ziarno, M., Żbikowska, A., & Majewska, E. (2021). Phenolic contents and antioxidant activity of extracts of selected fresh and dried herbal materials. *Pol. J. Food Nutr. Sci*, 71, 269-278.
18. Miran, M., Feizabadi, M. M., Kazemian, H., Kardan-Yamchi, J., Monsef-Esfahani, H. R., & Ebrahimi, S. N. (2018). The activity of *Levisticum officinale* WDJ Koch essential oil against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* . *Iranian journal of microbiology*, 10(6), 394 .
19. Miran, M., Monsef Esfahani, H., Moridi Farimani, M., Ahmadi, A. A., & Ebrahimi, S. N. (2018). Essential oil composition and antibacterial activity of *Levisticum officinale* Koch at different developmental stages. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(4), 1051-1055. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1507759>

20. Nikkhah, M., Habibi NAjafi, M., Hashemi, M., & Farhoosh, R. (2019). Antifungal activity and synergistic effects of thyme, cinnamon, rosemary and marjoram essential oils in combination, against apple rot fungi. *Journal of Food Research*, 29(1), 43-54.
21. Nooshkam, M., Varidi, M., & Bashash, M. (2019). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food chemistry*, 275, 644-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.083>
22. Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M. E., & Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). Utilization of Plantago major seed mucilage containing Citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1625-1639 .
23. Pires, S. M., Desta, B. N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B. T., Fayemi, O. E., Salvador, E. M., . . . Hoejskov, P. S. (2021). Burden of foodborne diseases: think global ,act local. *Current Opinion in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.006>
24. Rahmati-Joneidabad, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Identification of chemical compounds, antioxidant potential, and antifungal activity of Thymus daenensis essential oil against spoilage fungi causing apple rot. *Iranian Food Science and Technology Research*, 17(5), 691-700.
25. Rossi, Y. E., & Palacios, S. M. (2013). Fumigant toxicity of Citrus sinensis essential oil on Musca domestica L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. *Acta tropica*, 127(1), 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.03.009>
26. Shafaghat, A. (2011). Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of the hexane extract from root and seed of Levisticum persicum Freyn and Bornm. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20), 5127-5131.
27. Spréa, R. M., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Pereira, C., Pires, T. C., Alves, M. J., . . . Ferreira, I. C. (2020). Chemical and bioactive characterization of the aromatic plant *Levisticum officinale* WDJ Koch: A comprehensive study. *Food & function*, 11(2), 1292-1303. <https://doi.org/10.1039/C9FO02841B>
28. Tejeswini, M. G., Sowmya, H. V., Swarnalatha, S. P., & Negi, P. S. (2014). Antifungal activity of essential oils and their combinations in in vitro and in vivo conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(5), 564-570. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.814235>
29. Vehapi, M., Koçer, A. T., Yılmaz, A., & Özçimen, D. (2020). Investigation of the antifungal effects of algal extracts on apple-infecting fungi. *Archives of microbiology*, 202(3), 455-471. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01760-7>
30. Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
31. Yeganegi, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Asili, J., Alizadeh Behbahani, B., & 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>



Effect of wheat flour fortification with sesame flour on properties of Sangak and Barbari flour, dough and bread

Arman Naderi¹, Soheila Zarringhalami^{2*} 

Received: 2021.06.20

Revised: 2021.09.12

Accepted: 2021.10.10

Available Online: 2021.10.10

How to cite this article:

Naderi, A., Zarringhalami, S. (2022). Effect of wheat flour fortification with sesame flour on properties of Sangak and Barbari flour, dough and bread. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 711-723.

Abstract

Introduction: Bread is an important staple food widely consumed all over the world including Iran. The consumption of traditional breads in Iran, including Barbari, Sangak, Taftoon and Lavash, is steadily increasing because of its convenience and being a ready-to-eat food product normally consumed at breakfast, lunch and dinner. Hence, fortification of several types of bread with other cereals, pseudo cereals, legumes and oil seeds flours, has received considerable attention. Sesame, although referred to as “seed of immortality” and “queen of oilseeds” is considered as a rich food as it has a high nutritive quality. Apart from being a prominent oilseed (45-50%), sesame seeds are a rich source of protein (18–40%). Also, sesame was reported as a rich source of vitamins and minerals. Therefore, in the current study, the effect of wheat flour fortification with sesame flour at the ratio of 0, 5, 10 and 15 % on flour, dough, Sangak and Barbari samples properties was evaluated.

Material and Methods: Proximate analysis of flour samples (sesame, wheat and composite flour samples) including acid value, moisture, ash, protein and wet gluten contents of the flour samples were determined according to the AACC methods. Water absorption, dough development time, dough stability time, degree of softening and the ratio between resistance to extension and extensibility (R/E), of prepared dough samples were determined according to AACC 21-54 and AACC 10-54 standard methods. After 2 h of bread baking the crust color parameters (L^* , a^* and b^*) were determined using the Hunter–Lab Color flex Colorimeter (Hunter Associated Lab, Inc., Reston, VA, USA). Crumb Hardness was also measured 2 h after baking using a texture analyzer (Texture Analyzer, Brookfield, CT3, USA). The organoleptic characteristics (taste, aroma, color, texture and overall acceptability) of the prepared bread samples were evaluated by 15 trained panelists familiar with the traditional bread usually consumed, using 5-point hedonic scale (5 = like extremely, 1 =dislike extremely) test. The data was analyzed by one way analysis of variance (ANOVA). A multiple comparison procedure was performed by Duncan’s new multiple range test using SPSS Software. Significance of the difference was defined as $p < 0.05$.

Results and Discussion: According to the results obtained from flour samples analysis, sesame flour contained higher amounts of protein, lipid and ash and low amount of moisture and gluten than wheat flour. Furthermore, with increasing the amount of sesame flour, ash and protein contents of flour samples were increased, but their moisture and gluten contents were decreased. Furthermore, Farinograph parameters including water absorption and stability were decreased, but dough development time and degree of softening were increased with increasing the amount of sesame flour in the formulation. The results of Extensograph test also, showed the R/E ratio, which indicates dough stability during fermentation, was decreased when the sesame flour content increased. Therefore, the addition of sesame flour

1. MS Student, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2. Associate Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

(*Corresponding Author Email: zarringhalami@znu.ac.ir)

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71088.1064

induced to weaken the gluten network formation in dough samples. The qualitative characteristics results of bread samples showed that addition of sesame flour to bread formulation tends to decrease crumb hardness and had no effect on color attributes (L^* , a^* and b^*). Sensory evaluation results showed the higher total acceptability of Sangak and Barbari bread samples containing 10 and 5 % of sesame flour, respectively. In these ratios the color and texture of bread samples were also similar to related control bread samples. According to the results obtained in the current study and based on the functional properties of sesame flour (rich source of oil, protein, minerals, vitamins and antioxidant compounds) that reported by several previous studies, addition of 5 and 10 % of sesame flour in large scale production of Barbari and Sangak breads is recommended. Due to the high consumption of Sangak and Barbari breads in Iran, fortification of these breads can be effective in providing the daily needs of several nutrients.

Keywords: Barbari, Fortification, Sangak, Sesame flour, Wheat flour.

مقاله علمی-پژوهشی

اثر غنی سازی آرد گندم با آرد کنجد بر ویژگی های آرد، خمیر و نان های سنگک و بربری

آرمان نادری^۱ - سهیلا زرین قلمی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۳۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸

چکیده

در پژوهش حاضر، اثر غنی سازی آرد گندم با آرد کنجد در نسبت های صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد بر ویژگی های آرد، خمیر و نان های سنگک و بربری بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش میزان آرد کنجد، مقدار خاکستر و پروتئین آرد افزایش یافت، اما مقادیر رطوبت و گلوتن مرطوب کاهش پیدا کرد. به علاوه، شاخص های فارینوگرافی خمیر نظیر جذب آب و پایداری کاهش داشت، اما زمان گسترش و درجه نرم شدن خمیر افزایش یافت که بیانگر ضعیف شدن شبکه گلوتهی خمیر بود. نتایج اکستنسوگرافی نیز نشان داد که با افزایش میزان آرد کنجد، شاخص مقاومت به کشش نسبت به کشش پذیری کاهش پیدا کرد. بررسی نتایج ارزیابی سفتی بافت و رنگ نان ها نشان داد که افزودن آرد کنجد سبب کاهش سفتی بافت شد ولی اثر معنی داری بر شاخص های رنگی نان ها (L^* , a^* , b^*) نداشت. به علاوه ترکیب اسیدهای چرب نان ها نیز بهبود پیدا کرد. در نهایت در ارزیابی حسی، نان های سنگک و بربری به ترتیب حاوی ۱۰ و ۵ درصد آرد کنجد، بیشترین امتیاز پذیرش کلی را به دست آوردند.

واژه های کلیدی: آرد کنجد، بربری، سنگک، غنی سازی.

مقدمه

پودر سیب، تفاله گوجه فرنگی و کدو حلوائی که حاوی پروتئین، لیپید، فیبر، صمغ و ترکیبات زیست فعال هستند، انجام گرفته است (Pourmohammadi Mojaveri et al., 2021, Majzoobi et al., 2011, Peighambari et al., 2014, Jannati et al., 2018, Zarringhalami et al., 2021, Moazeni et al., 2018, Zanganeh Elahe, 2021).

دانه کنجد با نام علمی (*Sesame Indicum* L.)، که به نام دانه جاودانگی^۳ نیز معروف است، یکی از مهمترین و قدیمی ترین دانه های روغنی زراعی در جهان است (Tanwar and Goyal, 2021). بر اساس آمارهای منتشر شده جهاد کشاورزی در سال ۲۰۱۹، میزان تولید دانه ی کنجد در ایران با سطح زیر کشت ۵۱۶۱۰ هکتار، ۴۲۸۵۳ تن بوده است که در این بین، استان های کرمان، فارس، خوزستان، خراسان رضوی، بوشهر، هرمزگان، گلستان، یزد، کرمان و خراسان جنوبی رتبه های اول تا دهم را به خود اختصاص داده اند. حدود ۶۵ درصد از کل دانه های کنجد تولید شده در کشور، جهت استخراج روغن مصرف می شود (Ahmadi et al., 2019). اما علاوه بر روغن با ویژگی های تغذیه ای بالا به دلیل حضور اسیدهای چرب غیراشباع اولئیک و لینولئیک اسید و ترکیبات ضد اکسایش (Tanwar and Goyal, 2021, Sadeghi et al., 2010, Rangkadilok et al., 2010)، پروتئین موجود در کنجاله کنجد (۱۸-۴۰ درصد) غنی از

اصطلاح غنی سازی به عنوان یک راه کار جهت پیشگیری یا کنترل نقص برخی از ترکیبات در مواد غذایی و افزایش اثرات سلامت بخش آن ها تعریف شده است (Grimm and Sauter, 2020). در ابتدا غنی سازی فقط برای مواد غذایی محدودی استفاده می شد، اما امروزه در بسیاری از مواد غذایی از جمله فراورده های نانوائی، کاربرد گسترده ای پیدا کرده است (Dziki et al., 2014, Benayad et al., 2021). نان حاصل از آرد گندم، تقریباً در تمامی کشورها از جمله ایران، غذای اصلی مردم را تشکیل می دهد. این در حالی است که با استفاده از آرد گندم به تنهایی در تهیه بیشتر این نان ها از جمله نان های سنتی ایران نظیر سنگک و بربری، کیفیت تغذیه ای مطلوب، حاصل نمی شود. بنابراین غنی سازی و بهبود کیفیت تغذیه ای این نان ها به عنوان قوت غالب، می تواند در این زمینه بسیار مؤثر واقع شود. مطالعات مختلفی در زمینه غنی سازی نان سنگک و بربری با استفاده از آرد دانه های روغنی مختلف، حبوبات، غلات و شبه غلات و سایر افزودنی های مفید نظیر

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

* نویسنده مسئول: Email: zarringhalami@znu.ac.ir

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71088.1064

همچنین ویژگی‌های فارینوگرافی و اکستنسوگرافی خمیر (میزان جذب آب، زمان گسترش، زمان پایداری، درجه نرم شدن، مقاومت به کشش / کشش‌پذیری^(۱)) به ترتیب مطابق با استانداردهای AACC 21-54 و AACC 10-54 تعیین شد (AACC, 2000).

تهیه خمیر و پخت نان

برای تهیه خمیر، آرد (مقدار لازم)، مخمر (۰/۲ درصد آرد)، نمک (۰/۴ درصد آرد) و آب (طبق آزمون فارینوگرافی) در مخلوط‌کن دورانی با دور کند (۳۰ دور در دقیقه) مخلوط گردید. پس از فرایند تخمیر در دمای ۳۵-۳۰ درجه سلسیوس و به مدت ۵۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب برای نان‌های بربری و سنگک، پخت نان‌های سنگک و بربری در نانوائی‌های مرتبط محلی و به روش سنتی به ترتیب در دمای ۴۰۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس و زمان‌های ۵ و ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از سرد کردن در دمای محیط نانوائی، نان‌ها در کیسه‌های دربسته تا انجام آزمون‌های بعدی، در دمای محیط نگهداری شدند.

تعیین سفتی بافت نان

برای تعیین سفتی بافت نان‌ها، از دستگاه سنجش بافت (Texture Analyzer, Brookfield, CT3, USA) مجهز به پروب ۲ میلی‌متری و با سرعت ۲ میلی‌متر بر ثانیه طبق روش AACC شماره ۱۰-۷۴، ۲ تا ۳ ساعت بعد از پخت نان‌ها در دمای اتاق انجام گرفت (AACC, 2000). حداکثر نیروی مورد نیاز (نیوتن) برای نفوذ پروب به داخل بافت نان‌ها تا عمق نفوذ ۵۰ درصد، به عنوان سفتی بافت تعیین شد.

تعیین رنگ پوسته نان

تعیین رنگ پوسته‌های نان با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج (Hunter Associated Lab, Inc., Reston, VA, USA) انجام شد. نان‌ها در ابعاد ۴×۴ سانتی‌متر برش داده شده و درون ظرف شیشه‌ای مخصوص قرار گرفت. برای جلوگیری از نفوذ نور، ظرف با کاپ تیره رنگ مخصوص دستگاه پوشانیده شد. سپس شاخص‌های رنگی پوسته‌های نان شامل میزان روشنایی (L^*)، زردی (b^*) و قرمزی (a^*) با ۵ تکرار از نقاط مختلف نان تعیین شد (Agrahar-Murugkar, 2020).

ارزیابی حسی نان

به منظور انجام ارزیابی حسی نان‌ها از روش هدونیک ۵ نقطه‌ای (۱)، بسیار بد و ۵، بسیار خوب) استفاده شد. ویژگی‌های حسی نان‌ها

پتیدهای زیست-فعال و اسیدهای آمینه ضروری نظیر متیونین، والین و تریپتوفان که در بسیاری از پروتئین‌های گیاهی جزء اسیدهای آمینه محدودکننده هستند، می‌باشد (Tanwar and Goyal, 2021, Das and Bhattacharjee, 2015). به علاوه پروتئین‌های دانه کنجد از نظر تکنولوژیکی، خاصیت امولسیفایری مناسبی نیز دارند (Abirached et al., 2020). همچنین دانه کنجد سرشار از مواد معدنی به ویژه، کلسیم (۱۲۰۰ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و آهن (۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) و ویتامین‌های گروه B، A و E است (Tanwar and Goyal, 2021). بنابراین استفاده از دانه کامل کنجد جهت غنی‌سازی فرآورده‌های نانوائی، نسبت به روغن و کنجاله پروتئینی به تنهایی، ارجحیت دارد.

با توجه به جایگاه مهم نان در رژیم غذایی و ارزش تغذیه‌ای بالا و فراسودمند بودن دانه کنجد، غنی‌سازی آرد گندم با آرد کامل دانه کنجد می‌تواند بخشی از نیازهای تغذیه‌ای روزانه را تأمین کند. اما از آنجا که در کنار افزایش ارزش تغذیه‌ای، باید ویژگی‌های تکنولوژیکی و کیفی هم مدنظر قرار گیرند، هدف از پژوهش حاضر، غنی‌سازی آرد گندم مورد استفاده در تهیه نان‌های سنگک و بربری با آرد کامل دانه کنجد در سطوح صفر (شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد (وزنی/وزنی) و بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آردهای ترکیبی، ویژگی‌های فارینوگرافی و اکستنسوگرافی خمیر و ویژگی‌های نان‌های سنگک و بربری حاصل از آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

آرد گندم با درجه استخراج حدود ۸۲ درصد برای آرد بربری و ۹۰-۸۸ درصد برای آرد سنگک و مخمر خشک فعال به ترتیب از کارخانه آرد تک ستاره (بیجار، ایران) و شرکت رضوی (مشهد، ایران) تهیه شد. نمک و دانه‌های کنجد نیز از یکی از بازارهای محلی خریداری گردید. کلیه مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش، محصول شرکت مرک آلمان با درجه خلوص آزمایشگاهی بودند.

بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آردهای ترکیبی و خمیر حاصل از آن‌ها

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آردهای مختلف نظیر رطوبت، خاکستر (مواد معدنی)، پروتئین، گلوتن مرطوب، اسیدیته و دانه‌بندی با استفاده از الک‌ها با مش ۴۷۵، ۱۸۰ و ۱۲۵ میکرومتر، مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۳ تعیین شد (ISIRI, 103/2018b). سپس بعد از مدت زمان ۶۰ روز نگهداری آردها در دمای محیط انبار (دوره نگهداری رایج برای آردها)، عدد پراکسید مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۹ اندازه‌گیری گردید (ISIRI, 4179/ 2018a).

نتایج و بحث

برخی از ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آرد کنجد و آردهای سنگ و بربری در مقادیر مختلف جایگزینی با آرد کنجد، در جدول ۱ آورده شده است. مطابق نتایج، با افزایش میزان درصد آرد کنجد، میزان خاکستر، پروتئین و اسیدیته آردهای سنگ و بربری به طور معنی دار افزایش و میزان رطوبت و گلوتن آن ها کاهش یافت ($p < 0.05$). دلیل این تغییرات بیشتر به ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آرد کنجد مرتبط بود.

شامل طعم، بو، رنگ، بافت و پذیرش کلی توسط ۱۵ ارزیاب، بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

آنالیز آماری داده ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) با کمک نرم افزار SPSS (نسخه ۲۶، ایالات متحده آمریکا) انجام گردید. به منظور مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آرد سنگ و بربری در مقادیر مختلف جایگزینی با آرد کنجد

Table 1- Physical and chemical characteristics of Sangak and Barbari flours in different amounts of replacement with sesame flour

		hour					
Flour sample		Ash (%)	Moisture (%)	Protein (%)	Wet gluten (%)	Acidity (%)	Peroxide (meq O ₂ /kg)
Sangak	0	1.27± 0.02 ^b	13.23± 0.12 ^a	12.63± 0.06 ^c	33.53± 0.40 ^a	1.40± 0.00 ^d	0.75± 0.20 ^a
	5	1.29± 0.01 ^b	12.77± 0.25 ^b	12.67± 0.06 ^c	32.80± 0.10 ^b	1.53± 0.06 ^c	0.75± 0.10 ^a
	10	1.33± 0.01 ^a	12.23± 0.06 ^c	12.78± 0.12 ^b	32.07± 0.15 ^c	1.57± 0.00 ^b	0.76± 0.15 ^a
	15	1.34± 0.02 ^a	11.93± 0.21 ^d	13.13± 0.06 ^a	31.10± 0.36 ^d	1.65± 0.06 ^a	0.77± 0.10 ^a
Barbari	0	0.85± 0.02 ^b	13.23± 0.06 ^a	10.73± 0.12 ^b	28.97± 0.21 ^a	1.03± 0.06 ^c	0.65± 0.30 ^a
	5	0.85± 0.01 ^b	12.80± 0.10 ^b	10.77± 0.06 ^b	27.23± 0.15 ^b	1.10± 0.02 ^c	0.65± 0.20 ^a
	10	0.86± 0.01 ^b	12.07± 0.06 ^c	11.00± 0.00 ^a	25.77± 0.16 ^c	1.15± 0.00 ^b	0.67± 0.21 ^a
	15	0.88± 0.01 ^a	11.80± 0.20 ^d	11.10± 0.00 ^a	24.13± 0.12 ^d	1.25± 0.06 ^a	0.68± 0.20 ^a
Sesame flour		3.25± 0.20	0.80± 0.03	20.8± 0.21	-	1.78± 0.20	0.66± 0.10

*داده ها، میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد می باشند. حروف مختلف در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

*Data are the mean of three replicates ± standard deviation. Different letters in each column indicate significant differences between means at the 95% confidence level.

مقدار خاکستر را به طور معنی داری افزایش می دهد (Tavan et al., 2017).

با افزایش میزان جایگزینی آرد کنجد در آردهای سنگ و بربری، میزان رطوبت کاهش معنی دار پیدا کرد ($p < 0.05$)، به طوری که نمونه شاهد در هر دو آرد، دارای بیشترین میزان رطوبت و نمونه های دارای ۱۵ درصد جایگزینی، به دلیل میزان رطوبت کمتر آرد کنجد (0.03 ± 0.80 درصد) نسبت به آرد گندم (حدود ۱۳ درصد) کمترین میزان رطوبت را دارا بودند. از نظر مقایسه میزان پروتئین، نمونه های آرد سنگ دارای پروتئین بیشتری نسبت به نمونه های آرد بربری بود و آرد کنجد نیز میزان پروتئین بیشتری (۲۰/۸ درصد) از دو نوع آرد دیگر (حدود ۱۳ درصد) داشت. Obeta و همکاران (۲۰۲۰) و Bilyk و همکاران (۲۰۱۸) نیز میزان پروتئین کنجد را به ترتیب ۲۳ و ۱۹/۴ درصد گزارش کردند. از آنجا که میزان پروتئین آرد کنجد از آرد گندم بیشتر است، با افزایش میزان جایگزینی، مقدار پروتئین آردهای ترکیبی نیز افزایش معنی دار پیدا کرده است ($p < 0.05$). به طوری که نمونه آرد سنگ با جایگزینی ۱۵ درصد، دارای بیشترین (۱۳/۱۳ درصد) و نمونه شاهد آرد بربری دارای کمترین مقدار پروتئین (۱۰/۷۳)

مطابق نتایج، میزان خاکستر موجود در آرد سنگ، بیشتر از آرد بربری بود و این امر به دلیل درصد استخراج بالاتر و میزان سبوس و مواد معدنی بیشتر در آرد سنگ نسبت به آرد بربری است. میزان خاکستر آرد کنجد نیز بیشتر از دو نوع آرد دیگر به دست آمد. Obeta و همکاران (۲۰۲۰) و Bilyk و همکاران (۲۰۱۸) نیز به ترتیب میزان خاکستر کنجد را ۳/۴۰ و ۴/۸ درصد گزارش کردند. این اختلاف در میزان خاکستر می تواند به دلیل تفاوت در رقم و شرایط جغرافیایی کشت دانه باشد (Obeta et al., 2020 Bilyk et al., 2018). به دلیل میزان خاکستر بیشتر، با افزایش میزان جایگزینی آرد کنجد، میزان خاکستر آردهای ترکیبی به طور معنی داری افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). از آنجا که آرد کنجد حاوی مقدار زیادی مواد معدنی است (Tanwar and Goyal, 2021, Bilyk et al., 2018)، خاکستر آن حدود ۲ تا ۲/۵ درصد از آرد گندم بیشتر به دست آمد (جدول ۱) و افزایش مقدار خاکستر در آردهای ترکیبی با افزایش میزان جایگزینی، قابل انتظار بود. در مطالعه ای که Tavan و همکاران (۲۰۱۷) بر تأثیر کنجاله کنجد و پلی ساکارید محلول در آب سویا بر ویژگی های نان بربری انجام دادند نیز به این نتیجه رسیدند که افزودن کنجاله کنجد،

معنی‌دار افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). نتایج آزمون تعیین عدد پراکسید نمونه‌های آرد پس از مدت زمان ۶۰ روز نگهداری در بسته‌های پلی پروپیلنی در دمای محیط (۲۰-۲۵ درجه سلسیوس)، نشان داد که در مقدار عدد پراکسید نمونه‌های آرد بربری و سنگک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) و مهمتر این که اعداد پراکسید تمام نمونه‌ها در محدوده استاندارد (کمتر از ۱) قرار داشت.

دانه‌بندی آرد با استفاده از الک‌ها با مش‌های ۴۷۵، ۱۸۰ و ۱۲۵ میکرومتر

اندازه ذرات یا دانه‌بندی نمونه‌های مختلف آردهای سنگک و بربری به همراه محدوده استاندارد قابل قبول در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- اندازه ذرات آردهای سنگک و بربری حاوی مقادیر مختلف جایگزینی آرد کنجد (درصد رو و زیر الک‌ها)

Table 2- Particle size of Sangak and Barbari flours containing different amounts of sesame flour replacement (percentage of above and under the sieves)

Replacement of flours (%)		On the sieve of 475	On the sieve of 180	On the sieve of 125	Under the sieve of 125
Sangak	0	0.1± 0.01 ^d	10.8± 0.01 ^d	11.5± 0.07 ^d	77.6± 0.02 ^a
	5	0.2± 0.01 ^c	11.7± 0.01 ^c	17.1± 0.01 ^c	71.00± 0.07 ^b
	10	1.1± 0.01 ^b	16.1± 0.01 ^b	16.1± 0.07 ^b	58.8± 0.03 ^c
	15	1.2± 0.01 ^a	19.3± 0.01 ^a	19.3± 0.02 ^a	49.5± 0.01 ^d
Standard range		Max. 5	Max. 25	Max. 30	Min. 40
Barbari	0	0.05± 0.01 ^d	6.4± 0.01 ^d	13.1± 0.01 ^d	80.45± 0.01 ^a
	5	0.30± 0.01 ^c	8.8± 0.10 ^c	15.1± 0.01 ^c	75.48± 0.01 ^b
	10	0.5± 0.01 ^b	11.4± 0.01 ^b	19.2± 0.01 ^b	68.9± 0.01 ^c
	15	1.00± 0.01 ^a	22.00± 0.01 ^a	21.1± 0.01 ^a	55.9± 0.01 ^d
Standard range		Max. 2	Max. 18	Max. 30	Min. 50

* داده‌ها، میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف مختلف در هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

* Data are the mean of three replicates ± standard deviation. Different letters in each column indicate significant differences between means at the 95% confidence level.

نتایج آزمون‌های فارینوگراف و اکستنسوگراف

نتایج بررسی ویژگی‌های فارینوگرافی و اکستنسوگرافی خمیرهای حاصل از آردهای سنگک و بربری با درصدهای مختلف جایگزینی آرد کنجد، در جدول ۳ آورده شده است. مطابق نتایج جدول ۳، با افزایش میزان آرد کنجد، میزان جذب آب در مورد هر دو نوع آرد سنگک و بربری کاهش پیدا کرده است. این امر می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات آب‌گریز نظیر لیپیدها و کاهش ظرفیت جذب آب در آردهای ترکیبی باشد. به علاوه لیپیدها می‌توانند پروتئین‌ها (به‌ویژه گلوتن) و نشاسته را به‌طور نسبی احاطه کرده و از جذب آب توسط آن‌ها پیشگیری کنند (Aghamirzaei et al., 2018). در مطالعه‌ای Jovinipour (۲۰۲۱)، روی تأثیر جایگزین کردن آرد گندم با آرد کنجد، بیان کردند افزایش میزان روغن با افزایش مقدار آرد کنجد، سبب کاهش معنی‌داری در

درصد) در بین نمونه‌های موجود بود (Bilyk et al., 2018, Obeta et al., 2020). Akinoso و Makinde (۲۰۱۴) نیز در مطالعه‌ای با هدف غنی‌سازی آرد گندم با آرد کنجد سیاه، نشان دادند که با افزایش میزان آرد کنجد، میزان پروتئین نمونه‌های نان غنی شده به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند (Makinde and Akinoso, 2014). از نظر مقدار گلوتن مرطوب، از آنجا که آرد کنجد جزء آردهای بدون گلوتن است، بنابراین افزایش میزان جایگزینی، سبب کاهش معنی‌داری در مقدار گلوتن آردهای ترکیبی شد ($p < 0.05$).

میزان بالای اسیدیته آرد کنجد (1.78 ± 0.20 درصد)، می‌تواند به دلیل حضور اسیدهای چرب غیراشباع و حساسیت آن نسبت به شرایط تولید، حمل و نقل و نگهداری و به دنبال آن افزایش اسیدیته در آرد باشد (Rangkadilok et al., 2010). همین دلیل با افزایش درصد جایگزینی آرد کنجد، میزان اسیدیته آردهای ترکیبی به‌طور

اندازه ذرات آرد (دانه‌بندی) در میزان و سرعت جذب آب و ویژگی‌های شیمیایی، کیفی و رئولوژیکی خمیر و در نهایت یکنواختی بافت محصول نهایی تأثیر دارد (Azeem et al., 2020, Ahmed et al., 2019). بنابراین تعیین اندازه ذرات آرد ضروری می‌باشد. مطابق نتایج جدول ۲، آزمون دانه‌بندی برای همه نمونه‌های آرد در محدوده استاندارد قرار داشت. به علاوه در نمونه‌های آرد سنگک و بربری با افزایش درصد جایگزینی آرد کنجد، اندازه ذرات روی الک‌ها افزایش یافت. همچنین، در آزمون تعیین ذرات زیر الک ۱۲۵ میکرون، اندازه ذرات کاهش پیدا کرد که موید نتایج حاصل از دانه‌بندی توسط سایر الک‌های مورد استفاده می‌باشد. دلیل اصلی این امر می‌تواند حضور روغن در آرد کنجد و ایجاد خاصیت چسبندگی در آردها و باقی ماندن ذرات بیشتر روی الک و عبور کمتر از توری الک‌ها باشد.

میزان فیبر (۱۲ درصد) نسبت به مقدار روغن (۳۱-۴۸ درصد) در دانه کمتر است (Obeta et al., 2020; Bilyk et al., 2018)، میزان روغن موجود، عامل اصلی تعیین کننده در مقدار جذب آب است. از طرفی کوچک بودن اندازه ذرات آرد، عامل مهمی در میزان بیشتر جذب آب محسوب می شود. با افزایش اندازه ذرات آرد در اثر جایگزینی (جدول ۲)، میزان جذب آب نیز کاهش پیدا می کند.

میزان رطوبت نان نسبت به نمونه شاهد شد (Jovinipour, 2021). اما در برخی از مطالعه های انجام شده در زمینه افزودن دانه های روغنی به آرد گندم، گزارش شده است که میزان جذب آب نمونه های ترکیبی آرد، افزایش پیدا می کند و این امر را به سایر ترکیبات موجود در دانه ها نظیر فیبرها، صمغ ها و موسیلاژها که قدرت جذب آب بالایی دارند، نسبت داده اند (Gül and Şen, 2017, Rajiv et al., 2012). اما از آنجا که دانه کنجد، صمغ یا موسیلاژ تولید نمی کند و

جدول ۳- ویژگی های فارینوگرافی و اکستنسوگرافی خمیرهای حاصل از آردها با درصد های مختلف جایگزینی

Table 3- Farinograph and extensograph characteristics of dough samples obtained from flours with different replacement percentages

Replacement of flours (%)		Water absorption (%)	Development time (min)	Stability (min)	Mixing Tolerance Index (BU)	R/E (Cm/N)
Barbari	0	54.55± 0.07 ^a	1.90± 0.14 ^d	2.41± 0.01 ^a	48.00± 1.41 ^d	1.65± 0.07 ^a
	5	49.45± 2.90 ^b	1.93± 0.11 ^c	2.40± 0.00 ^b	51.00± 0.00 ^c	1.60± 0.01 ^b
	10	47.55± 0.49 ^c	1.95± 0.06 ^b	2.38± 0.04 ^c	54.00± 1.41 ^b	1.45± 0.07 ^c
	15	45.50± 0.00 ^d	2.15± 0.07 ^a	2.28± 0.04 ^d	62.5± 2.12 ^a	1.30± 0.01 ^d
Sangak	0	63.45± 0.49 ^a	2.95± 0.07 ^d	3.30± 0.14 ^a	50.5± 0.71 ^d	1.80± 0.01 ^a
	5	58.30± 1.84 ^b	2.90± 0.14 ^c	3.20± 0.14 ^b	53.00± 1.40 ^c	1.73± 0.04 ^b
	10	56.20± 0.14 ^c	3.60± 0.28 ^b	3.15± 0.35 ^c	57.00± 1.41 ^b	1.63± 0.04 ^c
	15	53.45± 0.49 ^d	3.65± 0.21 ^a	2.90± 0.28 ^d	63.5± 2.10 ^a	1.51± 0.01 ^d

* داده ها، میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد می باشند. حروف مختلف در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

* Data are the mean of three replicates ± standard deviation. Different letters in each column indicate significant differences between means at the 95% confidence level

مسئول ایجاد پایداری خمیر در برابر مخلوط کردن است، رقیق می شود. به طوری که در هر دو نمونه آرد، بالاترین پایداری مرتبط با نمونه شاهد به دست آمد.

طبق تعریف، درجه نرم شدن یا شاخص تحمل خمیر به مخلوط کردن اضافی (۱۲ دقیقه)، مقدار افت در واحد فارینوگراف از خط استاندارد ۵۰۰ واحد برابند است (Catterall and Cauvain, 2007). هر چه شبکه گلوتنی قدرت و انسجام بیشتری داشته باشد، میزان انحراف از خط ۵۰۰ واحد برابند کمتر است. مطابق نتایج جدول ۳، با افزودن آرد کنجد، این شاخص افزایش پیدا کرد که بیانگر ضعیف شدن شبکه گلوتنی خمیر بود (De Lamo and Gómez, 2018).

مقدار مقاومت به کشش / کشش پذیری (R/E)، معیاری برای بررسی قوت خمیر در زمان تخمیر است. هر چه این مقدار بیشتر باشد، خمیر زمان بیشتری را در طول زمان تخمیر، تحمل می کند. همان طور که از نتایج جدول ۳ مشخص است، با افزایش میزان جایگزینی آرد کنجد، این نسبت کاهش می یابد که بیانگر ضعیف شدن شبکه گلوتنی است. به طور کلی در پژوهش های مختلف، گزارش شده است که افزودن دانه های روغنی به طور معمول سبب کاهش مقاومت خمیر به کشش و ضعیف شدن آن می شوند (Rajiv et al., 2012).

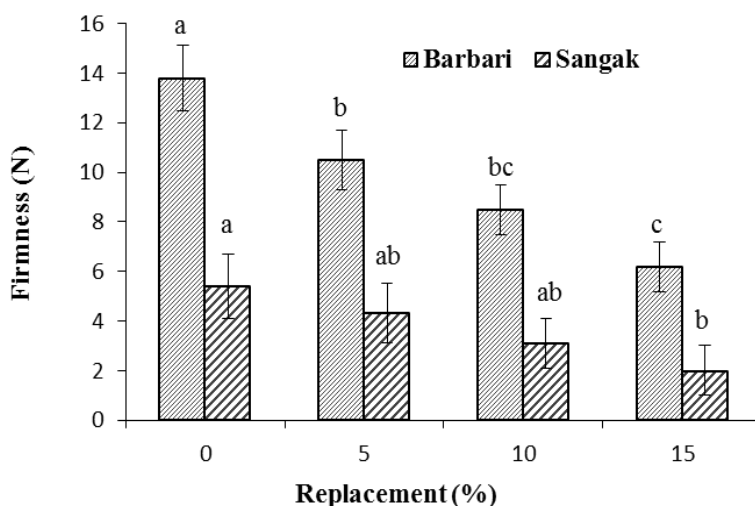
زمان گسترش خمیر که از زمان اضافه کردن آب به آرد تا رسیدن خمیر به حداکثر قوام محاسبه می شود، در هر دو نوع آرد، با افزایش میزان جایگزینی آرد دانه کنجد افزایش معنی داری یافت ($p < 0.05$). این امر احتمالاً به دلیل کاهش سرعت و میزان تشکیل شبکه گلوتنی و ضعیف شدن آن در نمونه های آرد ترکیبی نسبت به نوع شاهد است. احتمالاً روغن به عنوان یک عامل روان کننده برای پوشش دهی سطح ذرات آرد، با آب رقابت کرده و از تشکیل شبکه کامل گلوتنی پیشگیری می کند (Kumar et al., 2013). در جدول ۱، نیز مشخص شد با این که با افزایش میزان جایگزینی، میزان کل پروتئین در نمونه های آرد ترکیبی نسبت به آردهای شاهد افزایش یافت، اما میزان گلوتن کاهش پیدا کرد که در نتیجه آن شبکه گلوتنی ضعیف شد. به علاوه وجود روغن در دانه کنجد نیز به دلیل خاصیت آب گریزی می تواند در جذب آب، هم زدن مناسب خمیر و زمان گسترش خمیر، اختلال ایجاد کند.

زمان پایداری خمیر، اختلاف زمان رسیدن منحنی به خط ۵۰۰ واحد برابند (حداکثر قوام) تا زمان ترک این خط توسط منحنی است که هر چه این میزان بیشتر باشد توانایی خمیر نسبت به مخلوط کردن افزایش می یابد (Catterall and Cauvain, 2007). همان طور که ذکر شد، با افزایش میزان جایگزینی آرد کنجد، شبکه گلوتنی که

سفتی بافت نان

نتایج بررسی میزان سفتی بافت نان در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج شکل ۱ مشاهده می‌شود که با افزایش میزان درصد جایگزینی آرد کنجد، کاهش معنی‌داری در سفتی بافت نمونه‌های نان بربری و سنگ ایجاد شد ($p < 0.05$). در مورد نان بربری، نمونه شاهد بافت سفت‌تری از سایر نمونه‌ها داشت و نمونه‌های دارای ۵ و ۱۰ درصد آرد کنجد کمترین میزان سفتی بافت را داشتند. در مورد نان سنگ، نمونه‌های حاوی ۵ و ۱۰ درصد آرد کنجد از نظر سفتی بافت، اختلاف معنی‌داری با هم و با نمونه شاهد نداشتند ($p > 0.05$) و بین نمونه‌های حاوی آرد کنجد نیز اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). استفاده از ۱۵ درصد آرد کنجد در نان سنگ، موجب شد که نیروی کمتری برای نفوذ در بافت آن

استفاده شود که به معنی نرم‌تر شدن بافت این نان نسبت به نمونه شاهد است. یکی از دلایل کاهش سفتی بافت می‌تواند خاصیت آبریزی روغن کنجد و جلوگیری از جذب آب کافی توسط نشاسته و به دنبال آن کاهش میزان ژلاتینه شدن و برگشت نشاسته به عقب و در نهایت کاهش سفتی نان‌ها باشد. اما در مقادیر کم جایگزینی (۵ و ۱۰ درصد) به‌ویژه در نان سنگ، به دلیل تأثیر کمتر، روغن اثر معنی‌داری بر سفتی بافت نان‌ها نداشت ($p > 0.05$). از طرفی روغن در به-دام انداختن سلول‌های گازی و ایجاد تخلخل و جلوگیری از سفت شدن بافت هم می‌تواند مؤثر باشند. همچنین روغن می‌تواند سرعت حرکت یا مهاجرت آب از مرکز نان به سطح را کاهش داده و سفت شدن بافت را به تأخیر اندازد (Farmani et al., 2016).



شکل ۱- سفتی بافت مغز نان‌های سنگ و بربری

داده‌ها، میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف استاندارد می‌باشند. حروف کوچک لاتین نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

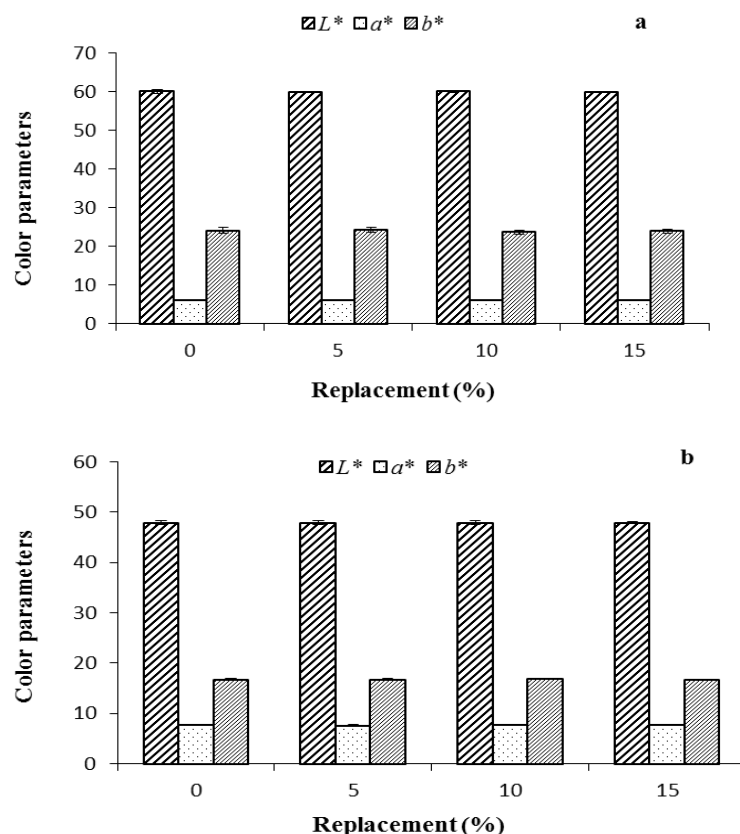
Fig. 1. Firmness of Sangak and Barbari

Data are the mean of three replicates $\pm$ standard deviation. Different letters in each column indicate significant differences between means at the 95% confidence level.

رنگ پوسته نان

نتایج ارزیابی شاخص‌های رنگی پوسته نان‌های سنگ و بربری به ترتیب در شکل ۲ الف و ب نشان داده شده است. رنگ نان علاوه بر اجزای مورد استفاده در فرمولاسیون وابسته به فرآیند پخت است. معمولاً رنگ انواع نان از طلایی تا قهوه‌ای متغیر است. واکنش میلارد و ایجاد هیدروکسی متیل فورفورال و ملانوئیدین‌ها عوامل اصلی ایجاد رنگ پوسته نان‌ها هستند. وقتی دما به بالای ۱۲۰ درجه سلسیوس می‌رسد و میزان فعالیت آبی به زیر ۰/۶ کاهش پیدا می‌کند، واکنش میلارد اتفاق می‌افتد. گزارش شده است که تغییرات مشخص در میزان شاخص‌های رنگی نان بیشتر زمانی اتفاق می‌افتد که دانه

های کامل، به خصوص اگر رنگی باشند، در فرمولاسیون مورد استفاده قرار گیرند. مطابق با نتایج شکل ۲، رنگ نان‌های مورد بررسی روشنی کم (مقدار شاخص روشنی ۶۰ و کمتر) و به دلیل مقادیر شاخص‌های a^* و b^* مثبت، متمایل به زرد و قرمز است (Melini et al., 2021). با افزایش میزان آرد کنجد در فرمولاسیون، میزان شاخص‌های روشنایی (L^*)، قرمزی (a^*) و زردی (b^*) پوسته نان‌ها اختلاف آماری معنی‌داری را نشان ندادند ($p > 0.05$). اما، طی پژوهشی، Agrahar-Murugkar گزارش کردند که افزودن آرد کنجد به فرمول نان گندم میزان شاخص‌های رنگی را به صورت جزئی اما معنی‌دار تغییر داده است (Agrahar-Murugkar, 2020).



شکل ۲- شاخص‌های رنگ پوسته نان‌های سنگک (الف) و بربری (ب).

داده‌ها، میانگین پنج تکرار $\pm$ انحراف استاندارد در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

Fig. 2. Crust color of Sangak (a) and Barbari (b)

Data are the mean of five replicates $\pm$ standard deviation at the 95% confidence level.

جدول ۴- نمایه اسیدهای چرب اصلی آردهای گندم و کنجد و نمونه‌های نان (درصد)

Table 4- Main fatty acids profile of wheat and sesame flours and bread samples (%)

Bread sample		Main fatty acids			
		Palmitic (C16:0)	Stearic (C18:0)	Oleic (C18:1)	Linoleic (C18:2)
Sangak	0	23.94 $\pm$ 0.88 ^a	3.99 $\pm$ 0.02 ^b	17.37 $\pm$ 0.87 ^b	46.15 $\pm$ 0.98 ^a
	5	22.10 $\pm$ 0.15 ^b	4.92 $\pm$ 0.19 ^a	19.81 $\pm$ 0.39 ^{ab}	44.63 $\pm$ 0.48 ^{ab}
	10	21.99 $\pm$ 0.36 ^c	5.556 $\pm$ 0.20 ^a	23.73 $\pm$ 0.60 ^{ab}	44.79 $\pm$ 0.27 ^{ab}
	15	20.48 $\pm$ 0.12 ^d	5.76 $\pm$ 0.05 ^a	27.94 $\pm$ 0.07 ^a	43.65 $\pm$ 1.05 ^b
Barbari	0	23.03 $\pm$ 0.50 ^a	4.20 $\pm$ 0.04 ^b	17.93 $\pm$ 0.99 ^b	46.53 $\pm$ 1.03 ^a
	5	22.51 $\pm$ 0.27 ^b	5.05 $\pm$ 0.81 ^{ab}	19.70 $\pm$ 0.48 ^{ab}	45.01 $\pm$ 0.52 ^{ab}
	10	21.15 $\pm$ 0.26 ^c	5.22 $\pm$ 0.17 ^a	23.98 $\pm$ 0.61 ^a	45.00 $\pm$ 2.36 ^{ab}
	15	20.65 $\pm$ 0.51 ^d	5.84 $\pm$ 0.05 ^a	27.19 $\pm$ 0.52 ^a	44.08 $\pm$ 0.58 ^b
Wheat flour		23.83 $\pm$ 0.81	3.75 $\pm$ 0.38	17.27 $\pm$ 0.21	46.25 $\pm$ 0.71
Sesame flour		11.07 $\pm$ 0.20	2.66 $\pm$ 0.30	40.36 $\pm$ 0.30	42.52 $\pm$ 0.50

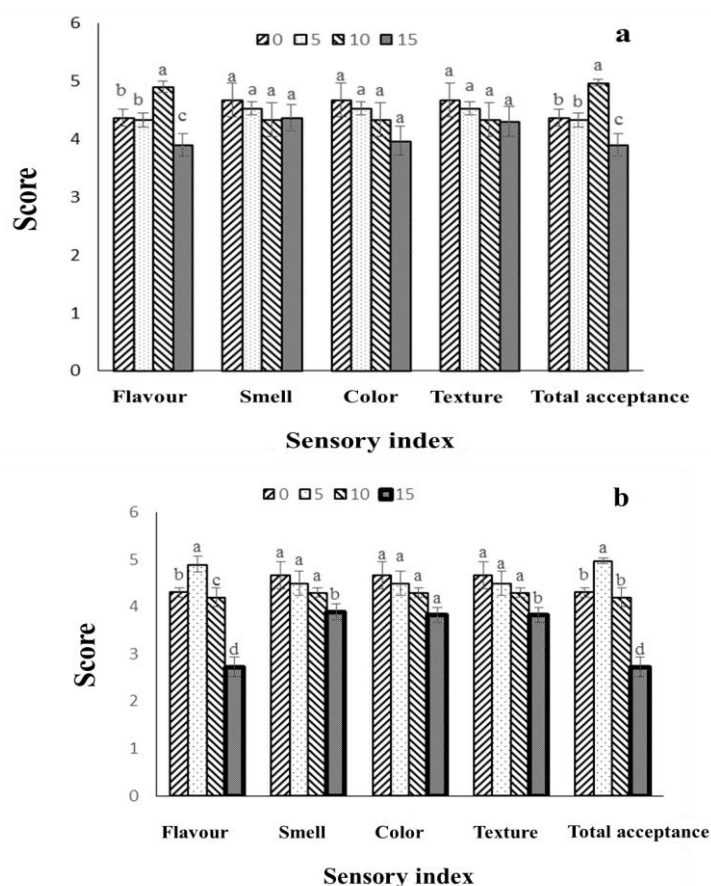
* داده‌ها، میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف استاندارد می‌باشند. حروف مختلف در هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

* Data are the mean of three replicates $\pm$ standard deviation. Different letters in each column indicate significant differences between means at the 95% confidence level.

نمایه اسیدهای چرب نمونه‌های آرد و نان

مطابق نتایج جدول ۴، بیشترین اسیدهای چرب موجود در آرد کنگد به ترتیب اسید لینولئیک، اولئیک، پالمیتیک و استئاریک و اسیدهای لینولئیک، پالمیتیک، اولئیک و استئاریک، عمده‌ترین اسیدهای چرب در آرد گندم بودند. به همین دلیل با افزایش میزان آرد کنگد در فرمولاسیون نان‌های سنگ و بربری، میزان اسیدهای چرب پالمیتیک و لینولئیک کاهش و برعکس میزان اسیدهای چرب استئاریک و اولئیک افزایش معنی‌دار پیدا کرد ($p < 0.05$). بالاتر بودن میزان اسید اولئیک در آرد کنگد ($40/36 \pm 0/30$ درصد) نسبت به آرد

گندم ($17/27 \pm 0/21$ درصد) و همچنین کمتر بودن مقدار اسید لینولئیک در آرد کنگد ($42/52 \pm 0/50$ درصد) در مقایسه با آرد گندم ($46/25 \pm 0/71$ درصد)، می‌تواند سبب پایداری بیشتر محصول در مقابل اکسید شدن در طول مدت زمان نگهداری شود. علاوه بر این، به دلیل مقدار کم اسیدهای چرب اشباع و نسبت متعادل اسید اولئیک و لینولئیک، روغن کنگد از نظر تغذیه‌ای نیز با ارزش است. تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف آرد کامل کنگد می‌تواند میزان کلسترول بد خون را تا میزان ۵۰ درصد کاهش و کلسترول خوب را تا میزان ۸۵ درصد افزایش دهد (Jafarnejadi et al., 2018).



شکل ۳- شاخص‌های ارزیابی حسی نان‌های سنگ (الف) و بربری (ب) با درصدهای مختلف آرد کنگد

داده‌ها، میانگین پانزده تکرار $\pm$ انحراف استاندارد می‌باشند. حروف کوچک لاتین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

Fig. 3. Sensory evaluation of Sangak (a) and Barbari (b) with different percentages of sesame flour.

Data are the mean of fifteen replicates $\pm$ standard deviation. Latin lowercase letters indicate significant differences between means at the 95% confidence level.

ارزیابی حسی

طعم و بوی نان و پذیرش کلی آن، وابسته به مواد موجود در فرمولاسیون متفاوت است و بر اساس ذائقه افراد، میزان پذیرش آن نیز متفاوت خواهد بود. با توجه به شکل ۳ در نان‌های سنگ فقط بین شاخص‌های طعم و پذیرش کلی اما در نان‌های بربری بین تمام

شاخص‌های ارزیابی نان به غیر از رنگ، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$). بیشترین و کمترین امتیاز طعم در نان سنگ به ترتیب مرتبط با نمونه حاوی ۱۰ و ۱۵ درصد آرد کنگد بود. در مورد نان بربری نیز بیشترین و کمترین امتیاز به ترتیب مربوط به نان بربری حاوی ۵ و ۱۵ درصد آرد کنگد بود. دلیل کم بودن امتیاز طعم در

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، به‌منظور غنی‌سازی نان‌های سنگک و بربری از آرد کنجد در مقادیر صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد استفاده شد. نتایج نشان داد که افزودن آرد کنجد سبب افزایش میزان پروتئین و مواد معدنی (خاکستر) آردها می‌شود. اما به‌دلیل تضعیف شبکه گلوته‌نی، ویژگی‌های فارینوگرافی و اکستنسوگرافی خمیر با افزایش میزان آرد کنجد، کاهش پیدا کرد. نتایج ارزیابی ویژگی‌های نان‌ها نشان داد که افزایش میزان آرد کنجد در فرمولاسیون نان، سبب کاهش سفتی یا نرم‌تر شدن بافت نان‌ها شد و در ویژگی‌های رنگی نان (شاخص‌های L^* ، a^* و b^*) نیز اثر معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). به علاوه ترکیب اسیدهای چرب آن‌ها نیز بهبود پیدا کرد. در نهایت مطابق با بررسی نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های ذکر شده و نتایج حاصل از ارزیابی حسی، به‌ترتیب نمونه‌های حاوی ۵ و ۱۰ درصد آرد کنجد از نان‌های بربری و سنگک، بالاترین امتیاز پذیرش کلی را به‌خود اختصاص دادند که بیانگر مطلوب بودن ویژگی‌های حسی این نان‌ها از نظر داوران بود. بنابراین استفاده از مقادیر ذکر شده به‌دلیل ارزیابی حسی بالاتر و نداشتن اختلاف آماری از نظر بافت و رنگ با نمونه‌های شاهد، در تولید در مقیاس وسیع نان‌های سنگک و بربری پیشنهاد می‌گردد.

نمونه‌های با ۱۵ درصد جایگزینی، طعم مشخص و غالب تند و نسبتاً تلخ حاصل از آرد کنجد در نان‌ها بود. Abd-Allah و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که بو و طعم کنجد در مقادیر بالای مورد استفاده (۱۰ درصد و بالاتر) توسط ارزیاب‌ها نامناسب گزارش شده است (Abd-Allah et al., 2017). این میزان جایگزینی در بوی نمونه‌های نان سنگک قابل تشخیص نبود اما در نمونه‌های بربری اختلاف معنی‌دار با بقیه نمونه‌ها مشاهده شد ($p < 0.05$).

در رابطه با رنگ نمونه‌ها، اختلاف آماری معنی‌داری بین نمونه‌های نان مشاهده نشد ($p > 0.05$) که با نتایج شکل ۲، در رابطه با ارزیابی دستگاهی رنگ نان‌ها همخوانی دارد. در ارزیابی پذیرش کلی نان‌های بربری و سنگک، به‌ترتیب نمونه‌های حاوی ۵ و ۱۰ درصد آرد کنجد بالاترین امتیاز را به‌خود اختصاص دادند. در پژوهش‌های پیشین در زمینه تهیه نان با آردهای گندم و کنجد نیز بیان شده است که جایگزینی آرد کنجد از ۵-۱۰ درصد سبب بهبود ویژگی‌های حسی و افزایش پذیرش کلی نان می‌گردد (Makinde and Obeta. Akinoso, 2014) و همکاران (۲۰۲۰) نیز گزارش کردند که غنی‌سازی آرد گندم با آرد کنجد سبب بهبود ویژگی‌های حسی (طعم، بو، رنگ، بافت و پذیرش کلی) نان می‌گردد (Obeta et al., 2020).

منابع

1. AACC. (2000). American Association of Cereal Chemists, Approved methods of analysis of the AACC. 10. ed. St. Paul.
2. Abd-Allah, E. F., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Wirth, S. & Egamberdieva, D. (2017). Calcium application enhances growth and alleviates the damaging effects induced by Cd stress in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Plant Interactions*, 12, 237-243. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1319500>
3. Abirached, C., Bonifacino, C., Dutto, E., Velazco, L., Jorge, F. & Vieitez, I. (2020). Study of sesame seeds antioxidant and emulsifying properties: Original high-quality research paper. *The Journal of Supercritical Fluids*, 166, 104994. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104994>
4. Aghamirzaei, M., Peighambaroust, S., Azadmard-Damirchi, S. & Majzoob, M. (2018). Effects of Grape Seed Powder as a Functional Ingredient on Flour Physicochemical Characteristics and Dough Rheological Properties. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 365-373. <http://hdl.handle.net/123456789/4234>
5. Agrahar-Murugkar, D. (2020). Food to food fortification of breads and biscuits with herbs, spices, millets and oilseeds on bio-accessibility of calcium, iron and zinc and impact of proteins, fat and phenolics. *LWT*, 130, 109703. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109703>
6. Ahmadi, K., Ebadzadeh, H., Hatami, F., Abdeshah, H. and Kazemian, A., (2019). Agricultural statistics of the crop year 2017-2018, Volume 1: crops. Ministry of Jihad Agriculture Publications, Tehran.
7. Ahmed, J., Thomas, L. & Arfat, Y. A. (2019). Functional, rheological, microstructural and antioxidant properties of quinoa flour in dispersions as influenced by particle size. *Food Research International*, 116, 302-311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.039>
8. Azeem, M., Mu, T. H. & Zhang, M. (2020). Influence of particle size distribution of orange-fleshed sweet potato flour on dough rheology and simulated gastrointestinal digestion of sweet potato-wheat bread. *LWT*, 131, 109690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109690>
9. Benayad, A., Taghouti, M., Benali, A., Aboussaleh, Y. & Benbrahim, N. (2021). Nutritional and technological assessment of durum wheat-faba bean enriched flours, and sensory quality of developed composite bread. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 635-642. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.053>

10. Bilyk, O., Bondarenko, Y., Hryshchenko, A., Drobot, V., Kovbasa, V. & Shutyuk, V. (2018). Studying the effect of sesame flour on the technological properties of dough and bread quality. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 3, 6-16. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2018.133233>
11. Catterall P. & Cauvain, S. P. (2007). Flour milling. Technology of breadmaking. Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-38565-7_12
12. Das, R. & Bhattacharjee, C. (2015). Processing sesame seeds and bioactive fractions. Processing and impact on active components in food, 385-394. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00046-9>
13. De Lamo, B. & Gómez, M. (2018). Bread enrichment with oilseeds. A review. *Foods*, 7, 191. <https://doi.org/10.3390/foods7110191>
14. Dziki, D., Różyło, R., Gawlik-Dziki, U. & Świeca, M. (2014). Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 40, 48-61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.010>
15. Farmani, J., Miarkiani, F. & Maghsoudlou, Y. (2016). Dough characteristics, baking performance, and staling of taftoon bread as affected by supplementation with sesame oil. *Journal of Culinary Science & Technology*, 14, 318-331. <https://doi.org/10.1080/15428052.2016.1138916>
16. Grimm, J. W. & Sauter, F. (2020). Environmental enrichment reduces food seeking and taking in rats: A review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 190, 172874. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172874>
17. Gul, H. & Şen, H. (2017). Effects of pomegranate seed flour on dough rheology and bread quality. *CyTA-Journal of Food*, 15, 622-628. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1327461>
18. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (ISIRI). (2018a). Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination. ISIR No. 4179, 2nd Revision.
19. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (ISIRI). (2018b). Wheat flour – Specifications and test methods. ISIR No. 103, 6th Revision.
20. Jafarnejadi, A., Eyvazzadeh, O. & Azizi-Tabrizad, M. (2018). Evaluating the influence of sesame oil and Psyllium seed mucilage usage, on the sensory and chemical properties of oil cake. *Journal of food science and technology* (In Persian), 14(72), 133-153.
21. Jannati, N., Hojjatoleslami, M., Hosseini, E., Mozafari, H. R. & Siavoshi, M. (2018). Effect of apple pomace on rheological properties of dough and Sangak bread texture. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 10(2), 77-84.
22. Jovinipour, S. (2021). Investigating the function of replacing wheat flour with whole sesame powder on the farinographic, chemical and sensory properties of Sangak bread. 2nd International Congress on Food Science & Technology & Agriculture and Food Security, Tehran, Iran.
23. Kumar, R., Livneh, B. & Samaniego, L. (2013). Toward computationally efficient large-scale hydrologic predictions with a multiscale regionalization scheme. *Water Resources Research*, 49, 5700-5714. <https://doi.org/10.1002/wrcr.20431>
24. Lachowicz, S., Świeca, M. & Pejcz, E. (2021). Biological activity, phytochemical parameters, and potential bioaccessibility of wheat bread enriched with powder and microcapsules made from Saskatoon berry. *Food Chemistry*, 338, 128026. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128026>
25. Majzoobi, M., Ghavi, F. S., Farahnaky, A., Jamalian, J. & Mesbahi, G. (2011). Effect of tomato pomace powder on the physicochemical properties of flat bread (Barbari bread). *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, 247-256. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00447.x>
26. Makinde, F. & Akinoso, R. (2014). Physical, nutritional and sensory qualities of bread samples made with wheat and black sesame (*Sesamum indicum* Linn) flours. *International Food Research Journal*, 21, 1635.
27. Melini, V., Melini, F., & Acquistucci, R. (2020). Nutritional characterization of an Italian traditional bread from ancient grains: the case study of the durum wheat bread "Pane di Monreale." *European Food Research and Technology*, 247(1), 193-200. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03617-6>
28. Moazeni, M., Zarringhalami, S. & Ganjloo, A. (2018). Effect of barbari dough enrichment with quinoa whole flour on farinograph characteristics and bread quality. *Journal of Food Research* (University of Tabriz), 28(4), 103-112.
29. Obeta, N. A., Otuu, C. E., Ugwuona, F. U. & Peter, E. S. (2020). Processing treatments of beniseed (*Sesamum indicum* Linn) on nutrients, anti-nutrients composition and functional properties of flour. *Food and Nutrition Sciences*, 11, 314. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.114023>
30. Peighambaroust, S. & Aghamirzaei, M. (2014). Physicochemical, nutritional, shelf life and sensory properties of Iranian Sangak bread fortified with grape seed powder. *Journal of Food Processing and Technology*, 5.
31. Pourmohammadi Mojaveri, O., Hosseini Ghaboos, S. H. & Jafarian, S. (2021). Effect of different concentrations of balangu seed gum on the physicochemical, textural and sensory properties of sangak bread enriched with pumpkin powder. *Journal of food science and technology* (In Persian), 18, 189-200. <https://doi.org/10.52547/fsct.18.111.189>

32. Rajiv, J., Indrani, D., Prabhasankar, P. & Rao, G. V. (2012). Rheology, fatty acid profile and storage characteristics of cookies as influenced by flax seed (*Linum usitatissimum*). *Journal of Food Science and Technology*, 49, 587-593. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0307-2>
33. Rangkadilok, N., Pholphana, N., Mahidol, C., Wongyai, W., Saengsooksree, K., Nookabkaew, S. & Satayavivad, J. (2010). Variation of sesamin, sesamolin and tocopherols in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds and oil products in Thailand. *Food Chemistry*, 122, 724-730. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.044>
34. Sadeghi, N., Oveisi, M. R., Hajimahmoodi, M., Jannat, B., Mazaheri, M. & Mansouri, S. (2010). The contents of sesamol in Iranian sesame seeds. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 101-105.
35. Tanwar, B. & Goyal, A. (2021). Oilseeds: health attributes and food applications, Springer Nature Singapore Pte Ltd. 507 p. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4194-0_7
36. Tavan, Z. Hojjati, M. Nasehi, B. Jooyandeh, H. (2017). Effect of sesame meal and soluble soybean polysaccharide on properties of Barbary bread. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 48, 233-242. <https://doi.org/10.22059/IJBSE.2017.62475>
37. Zanganeh, E. Zarringhalami, S. Hemmati, R. (2021). Application of quinoa flour in sourdough fermented with *Lactobacillus plantarum* and evaluation of its effect on the qualitative and nutritional characteristics of Lavash. *Journal of Applied Microbiology in food industry*, 7, 73-88.
38. Zarringhalami, S., Ganjloo, A. & Mokhtari-Nasrabadi, Z. (2021). Optimization xanthan gum, Roselle seed and egg white powders levels based on textural and sensory properties of gluten-free rice bread. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 1124-1131. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04626-9>



Enzymatic extraction of sulfated polysaccharide from the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and evaluation of its chemical, antioxidant and functional properties

Shahab Naghdi¹, Masoud Rezaei^{*2}, Mehdi Abdollahi³, Mehdi Tabarsa⁴

Received: 2021.10.21

Revised: 2022.02.06

Accepted: 2022.02.16

Available Online: 2022.02.16

How to cite this article:

Naghdi, Sh., Rezaei, M., Abdollahi, M., Tabarsa, M. (2022). Enzymatic extraction of sulfated polysaccharide from the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and evaluation of its chemical, antioxidant and functional properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 725-738.

Abstract

Introduction: Bioactive compounds are substances found in small amounts in food. In addition to their influence on human development, these compounds also play a crucial role in reducing diseases in human. Polysaccharides are a group of bioactive compounds that come from a variety of sources. Polysaccharides are macromolecules that are usually composed of more than ten monosaccharides. The constituent monosaccharides are arranged linearly or branched together through glycoside bonds, depending on the length of the chain and the number of constituent monosaccharides. They also have different molecular weight. Polysaccharides, like other essential macromolecules such as proteins and poly-nucleotides in the body, are essential for the flaxseed body's daily activities and play an influential role in cell-cell communication, cell adhesion, and the identification of molecules in the immune system. A group of polysaccharides derived from marine sources are sulfated polysaccharides. These polysaccharides are a broad branch of the resulting polysaccharides. In industrial quantities, sulfated polysaccharides are produced from pig skin and pig bone, and there are some restrictions on the use of these products in some countries. The limitations on the use of these products made from pig waste are the risks of transmitting influenza, as well as the prohibition of pork in some Islāmic countries. In this regard, by-products from seafood processing, which account for about 20 to 50 percent of the initial weight of raw material, are one of the sources that researchers are considering to extract these compounds.

Material and Method: After preparation of the by-product, it was covered with ice in a ratio of 1 to 3 and transferred to the laboratory of Tarbiat Modares University. The sample was then washed and then ground. Finally, it was packed in plastic bags and kept in the freezer at -18 ° C until the day of experiment. Then, the enzymatic hydrolysis method and precipitation by ethanol were used to get sulfated polysaccharides. Chemical analyses were performed to determine carbohydrates, sulfates, proteins, and uronic acid content. The FTIR spectrum of extracted sulfate polysaccharide was determined using an FTIR spectrophotometer in the range of 400-4000 cm⁻¹. Evaluation of antioxidant properties of obtained sulfate polysaccharide was assessed by DPPH free radical scavenging activity, ABTS

1. PhD Student, Department of Fishery Processing, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2. Professor, Department of Fishery Processing, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3. Researchers, Department of Biology and Biological Engineering, Food Science and Nutrition, Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden.

4. Associate Professor, Department of Fishery Products Processing, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

(*Corresponding Author Email: rezai_ma@modares.ac.ir)

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2022.72999.1102](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.72999.1102)

free radical scavenging activity, and ferrozine tests. Emulsifying and foaming properties were also evaluated as functional properties.

Results and Discussion: In the present study, sulfated polysaccharide was extracted from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin by pepsin enzyme and its FTIR spectrum, carbohydrate, sulfate, uronic acid and protein were analyzed. The results of the chemical analysis of the extracted polysaccharide showed that the extraction efficiency was $3.23 \pm 0.02\%$, as well as the percentage of carbohydrate and protein of the obtained polysaccharide was 57.03 ± 2.56 , $7.78 \pm 0.43\%$ respectively. Also, the amount of sulfate and uronic acid were 6.54 ± 0.77 and 3.86 ± 0.43 , respectively. The results of infrared spectroscopy showed the presence of a broad peak in the range between 3350 and 3450 cm^{-1} for the $-\text{OH}$ group and the $\text{S}=\text{O}$ sulfate flexural band in the range of 1245 cm^{-1} . An increasing and significant trend was observed in different concentrations used for the DPPH test ($p < 0.05$) which had the highest neutralizing power (38.85%) at a concentration of 2 mg/ml . The highest percentage of ABTS radical chelating was observed at a concentration of 4 mg/mm of distilled water with 71.70% ($p < 0.05$). The chelating results of the extracted polysaccharide against ferrous ions showed that the highest chelating percentage was 98.43% ($p < 0.05$). The foaming capacity, stability properties of the foam, and the emulsifying ability of the studied sample showed a trend of increasing the concentration coefficient of the sample ($p < 0.05$), and the concentration of 10% used sulfated polysaccharide had the highest foaming percentage ($72/22\%$) and foam stability (62.22%) ($p < 0.05$). The emulsifying property of extracted sulfate polysaccharide against soybean oil was higher in all concentrations used than sunflower oil ($p < 0.05$), and the highest value of that was related to the concentration of 10% with 86.57% and 92.59% against sunflower oil and soybean oil ($p < 0.05$). The obtained results demonstrated that the fish skin extracted polysaccharide can serve as a natural antioxidant and functional agent in the food industry.

Keywords: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Sulfated polysaccharide, Antioxidant properties, Foaming properties, Emulsifying properties.

مقاله علمی-پژوهشی

استخراج آنزیمی پلی ساکارید سولفات‌ها از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و بررسی شیمیایی، خواص ضد اکسیدانی و کارکردی آن

شهاب نقدی^۱ - مسعود رضائی^{۲*} - مهدی عبدالمهی^۳ - مهدی طبرسائی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷

چکیده

در مطالعه حاضر پلی ساکارید سولفات‌ها از پوست ماهی قزل‌آلا توسط آنزیم پپسین استخراج شد و آنالیزهای FTIR، کربوهیدرات، سولفات، یورونیک اسید و پروتئین آن انجام شد. نتایج آنالیز شیمیایی پلی ساکاریدهای استخراج شده نشان داد که بازده استخراج $0.2 \pm 3.2\%$ بود، همچنین درصد کربوهیدرات و پروتئین نمونه به دست آمده $2.56 \pm 0.37\%$ و $43 \pm 7.78\%$ بود. همچنین مقدار سولفات و یورونیک اسید به ترتیب $0.77 \pm 0.54\%$ و $3 \pm 0.86\%$ بود. نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز نشان داد یک پیک پهن در ناحیه 3350 تا 3450 cm^{-1} مربوط به گروه OH- و باند خمشی سولفات S=O در ناحیه 1245 cm^{-1} ظهور پیدا کرد. یک روند افزایشی و معنی‌دار در غلظت‌های مختلف مورد استفاده برای تست DPPH مشاهده شد ($p < 0.05$) که بالاترین قدرت خنثی‌کنندگی (38.88%) در غلظت ۲ میلی گرم/ میلی لیتر مشاهده شد. بالاترین درصد شلاته‌کنندگی رادیکال ABTS در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر آب مقطر با درصد (71.70%) مشاهده شد ($p < 0.05$). نتایج شلاته‌کنندگی یون‌های فروزین پلی ساکارید استخراج شده نشان داد که بالاترین درصد شلاته‌کنندگی 98.43% بود ($p < 0.05$). ظرفیت کف‌کنندگی، خواص پایداری کف و ظرفیت امولسیون‌کنندگی نمونه مورد مطالعه حاکی از یک روند افزایشی با افزایش غلظت نمونه بود ($p < 0.05$) و غلظت 10% پلی ساکارید سولفات‌ها استفاده شده بالاترین درصد کف‌کنندگی (72.22%) و پایداری کف (62.22%) را از خود نشان داده است ($p < 0.05$). خاصیت امولسیون‌کنندگی پلی ساکارید سولفات‌ها استخراج شده در برابر روغن سویا در تمامی غلظت‌های استفاده شده بیشتر از روغن آفتابگردان بود ($p < 0.05$) و بالاترین مقدار این خاصیت مربوط به غلظت 10% با عدد 86.57% و 92.59% به ترتیب در برابر روغن آفتابگردان و روغن سویا بود ($p < 0.05$).

واژه‌های کلیدی: ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، پلی ساکارید سولفات‌ها، ضد اکسیدانی، کف‌کنندگی، امولسیون‌کنندگی.

مقدمه

فعال موجود در میوه‌جات و سبزی‌ها به مبارزه با بیماری‌های قلبی، سرطان، چاقی، دیابت و اختلال در دستگاه گوارش کمک می‌کند (Shahidi, 2012; Xu et al., 2017a). به تازگی مطالعات زیادی بر روی انواع مواد غذایی و فرآورده‌های طبیعی دیگر و بررسی این احتمال که آن‌ها منبع عوامل درمانی و پیشگیری‌کننده هستند، انجام شده است. در این رابطه گروهی از مواد غذایی که اگر به‌طور منظم و مناسب مصرف شوند علاوه بر خواص طبیعی خود، اثرات سلامت بخش نیز دارند فراسودمند نامیده می‌شوند (Odeleye et al., 2019). از اجزای زیست فعالی که امروزه مورد توجه هستند می‌توان به پلی ساکاریدهای سولفات‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، پروتئین‌های هیدرولیز شده، اسیدهای چرب امگا ۳ و ۶ استخراج شده از منابع متنوع گیاهی و حیوانی اشاره کرد (Joana et al., 2013; Odeleye et al., 2019). برخی از منابع غذایی همانند ماهی و سایر آبزیان به‌خودی خود حاوی این ترکیبات ارزشمند بوده و تاثیرات سلامتی بخش آن‌ها بر

ترکیبات زیست فعال عناصر مغذی هستند که در مقادیر کم در غذا یافت می‌شوند. این ترکیبات علاوه بر تأثیری که در رشد و نمو انسان دارند نقش بسیار مهمی نیز در کاهش خطر بیماری‌ها نقش مهمی در سلامت و ایمنی جامعه ایفا می‌کنند. مصرف ترکیبات زیست

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- محقق، گروه زیست‌شناسی و مهندسی بیولوژیکی، علوم غذایی و تغذیه، دانشگاه صنعتی چالمرز، گوتنبرگ، سوئد.

۴- دانشیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

* نویسنده مسئول: Email: rezai_ma@modares.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.72999.1102

کسی پوشیده نیست. این مواد غذایی از گذشته مورد توجه مصرف کنندگان بوده‌اند اما در طی چند دهه اخیر به دلیل تحقیقاتی که بر روی بررسی اثرات مفید این مواد غذایی در سلامت بدن انجام شده است بیش از پیش مورد توجه محققان، مصرف‌کنندگان و نهایتاً صنعت قرار گرفته‌اند (Shahidi, 2012; Ye et al., 2018).

پلی‌ساکاریدها گروهی از ترکیبات زیست‌فعال هستند که از منابع متفاوتی تهیه می‌شوند. پلی‌ساکاریدها درشت مولکول‌های طبیعی هستند که معمولاً از بیش از ده مونوساکارید تشکیل شده است که مونوساکاریدهای تشکیل‌دهنده آن از طریق پیوندهای گلیکوزیدی به صورت خطی یا منشعب در کنار هم قرار گرفته‌اند که با توجه به طول زنجیره و تعداد مونوساکاریدهای تشکیل‌دهنده دارای وزن مولکولی متفاوتی نیز هستند (Xu et al., 2017; Xie et al., 2016). پلی‌ساکاریدها مانند سایر ماکرومولکول‌های ضروری بدن مثل پروتئین‌ها و پلی‌نوکلئوتیدها برای فعالیت‌های روزمره بدن بسیار ضروری بوده و نیز نقش بسیار مهمی در ارتباطات سلول-سلول، چسبندگی سلول و شناسایی مولکول‌های شاخص در سیستم ایمنی ایفا می‌کنند (Yang, 2009; Dong et al., 2019; and Zhang, 2019). در سال‌های اخیر پلی‌ساکاریدها از منابع طبیعی مختلفی از قبیل گیاهان، جلبک‌ها، حیوانات و قارچ‌ها مشتق شده‌اند و به دلیل برخی ویژگی‌های دارویی خود از قبیل خواص ضدالتهابی، ضداسیدانی و ضدتوموری توجه بسیار زیادی را به‌خود معطوف کرده‌اند (Cho et al., Yu et al., 2018; 2015). ثابت شده است که آرابینوگالاکتان^۱، گالاکتومانان^۲ و پلی‌ساکاریدهای پکتیکی^۳ مشتق شده از گیاهان عالی، بتاگلوکان‌ها^۴، گلیکوپروتئین‌های مشتق شده از قارچ‌ها پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه مشتق شده از گیاهان دریایی دارای خواص زیست‌فعالی مناسب می‌باشند (Gilar et al., 2011; Yu et al., 2018). دسته‌ای از پلی‌ساکاریدهای مشتق شده از منابع دریایی پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه هستند. این دسته از پلی‌ساکاریدها یک شاخه گسترده از پلی‌ساکاریدهای به‌دست آمده را به‌خود اختصاص می‌دهند. این ماکرومولکول‌ها به فراوانی در دیواره سلولی جلبک‌های دریایی یافت می‌شوند (Alboofetileh et al., 2019). این ماکرومولکول‌ها با توجه به منبعی که از آن استخراج می‌شوند خواص زیست‌فعالی و کارکردی متفاوتی نیز دارند و همچنین نام‌های متفاوت برای آن‌ها در نظر گرفته شده است. از خواص زیست‌فعالی که در این ترکیبات مورد توجه قرار گرفته است می‌توان به خواص ضدالتهابی، ضداسیدانی و ضدتوموری اشاره کرد (Cho et al., 2015; Yu et al., 2018).

- 1 Arabinogalactan
- 2 Galactomannan
- 3 Pectic polysaccharides
- 4 β -glucans

توجه به گرایش مصرف‌کننده‌ها به سمت ترکیبات زیست‌فعال دریایی به‌ویژه پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه صنعت نیز به این سمت و سو گرایش پیدا کرده است (Pomin & Mulloy, 2018). از همین رو توجه به تولید و استخراج بیش از قبل این ترکیبات در زندگی بشر احساس می‌شود. در مقیاس صنعتی پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه از پوست و استخوان خوک تهیه می‌شوند که محدودیت‌هایی در مصرف این محصولات در برخی کشورها وجود دارد که می‌توان به خطرات ناشی از انتقال آنفولانزای خوکی و همچنین حرام بودن گوشت خوک در برخی کشورهای اسلامی اشاره کرد (Arima et al., 2013). منابعی دیگری نیز برای تولید مشتقات متنوع پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه از قبیل کندرتین سولفات^۵ و درماتان سولفات^۶ وجود دارد که یکی از این منابع تاج مرغ است که دارای نقاط ضعفی مثل هزینه بالای تولید می‌باشد (Jridi et al., 2018; Arima et al., 2013). با توجه به معایب و نقص‌هایی که در منابع مورد استفاده برای پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه وجود دارد محققین و صنعت به‌دنبال یافتن یک منبع جایگزین مناسب و ارزان قیمت می‌باشند. صنعت شیلات با تولید ۱۶۷/۲ میلیون تن آبزیان در سال ۲۰۱۸، که سهم ایران ۹۴۷ هزار تن بوده است یک جایگزین بسیار مناسب برای تولید این ترکیبات است (FAO, 2018). در همین راستا باقی‌مانده‌های خام حاصل از فرآوری آبزیان که نزدیک به ۲۰ تا ۵۰ درصد وزن اولیه ماهی را شامل می‌شوند یکی از این منابعی است که امروزه مورد توجه محققین قرار گرفته است (Zamora-Sillero et al., 2018). این میزان ضایعات به یک مشکل زیست‌محیطی مهم بدل شده است، ولی می‌توان به عنوان یکی از اصلی‌ترین منابع مورد استفاده در تولید پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه باشد. از همین رو هدف از مطالعه حاضر استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه از پوست ماهی قزل‌آلا و بررسی ترکیبات شیمیایی، خواص ضداسیدانی و کارکردی آنها بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی

نمونه‌های پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از فروشگاه‌های بازار ماهی فروشان شهرستان نور تهیه شد. سپس، نمونه‌ها پس از تهیه با نسبت ۱ به ۳ با یخ پوشیده شده و به دانشگاه منتقل شدند. سپس نمونه‌ها شسته شده و در ادامه چرخ شدند. در نهایت در بسته‌های پلاستیکی بسته‌بندی شده و تا زمان استفاده در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه

- 5 Chondroitin sulfate
- 6 Dermatan sulfate

شد. سپس ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (LAMBDA 365) خوانده شد. از اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد برای مقایسه استفاده شد. از قدرت خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH نمونه‌ها طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$RSA = [1 - ((A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}})] \times 100 \quad (1)$$

A sample: جذب نمونه بعد از زمان موردنظر (نمونه و محلول حاوی رادیکال‌های آزاد).

A control: جذب محلول حاوی رادیکال‌های آزاد بدون نمونه.

A sample blank: جذب نمونه بعد از زمان موردنظر (نمونه بدون محلول حاوی رادیکال‌های آزاد).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS^۱

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS پلی ساکارید استخراج شده با روش Borazjani و همکاران (۲۰۱۷) مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که در ابتدا برای تهیه محلول رادیکال پایدار ABTS ابتدا یک محلول ۷ مولار آن در آب مقطر تهیه شد. در ادامه به محلول پتاسیم پر سولفات ۲/۴۵ میلی مولار اضافه شده و در مکانی تاریک به مدت ۱۶ ساعت برای تشکیل کاتیون‌های سبز-آبی نگهداری شد. سپس محلول نهایی تا حدی رقیق شد که مقدار جذب آن به ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر برسد. در ادامه ۰/۵ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف پلی ساکارید و اسید آسکوربیک (۱، ۲، ۳ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر) به ۱/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۷ میلی مولار تهیه شده ABTS افزوده شد (Borazjani et al., 2017). به منظور کنترل واکنش از ترکیب ABTS و اتانول استفاده شد. محلول حاصل در میکروپلیت نگهداری شده و در انتها جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS بر طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$ABTS \text{ scavenging activity } (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (2)$$

که A_c جذب نمونه کنترل (۰/۵ میلی لیتر اتانول همراه با ۱/۵ میلی لیتر محلول ABTS و A_s به عنوان جذب نمونه می باشد).

قدرت شلاته کنندگی یون‌های فروزین

برای اندازه گیری قدرت کاهندگی یون‌های فروزین برای نمونه پلی ساکاریدهای سولفات‌ها از روش Chew و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH= ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانات پتاسیم ۱٪ با ۱ میلی لیتر بر

ابتدا ۱۰۰ گرم از نمونه‌های هموژن شده در ۵۰۰ میلی لیتر بافر هیدروکلریک اسید- پتاسیم کلراید ۵۰ میلی مولار pH معادل ۲ اضافه شد. سپس برای غیرفعال سازی آنزیم‌های داخلی ظرف حاوی نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شدند. در ادامه بعد از تنظیم درجه حرارت مقدار ۱۰۰ میلی گرم آنزیم پپسین به مخلوط اضافه شده و مخلوط تهیه شده به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد. پس از طی این زمان به مخلوط اجازه داده شد تا دمای اتاق سرد شده، سپس سانتریفوژ شدند و در ادامه تحت خلا فیلتر شد. در ادامه برای استخراج پلی ساکاریدها به وسیله اتانول، ماده به دست آمده از عملکرد آنزیمی برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در سانتریفوژ در ۳۵۰۰ سانتریفوژ شد و لایه رویی جمع‌آوری شده و در اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت و رسوب داده شد. بخش رسوب داده شده در آب مقطر ریخته شده و خشک کن انجمادی (FD-5003-BT) شد. لوله‌های فالتون پلی ساکاریدهای استخراج شده تا زمان استفاده بعدی در فریزر نگهداری شدند (Jridi et al., 2018).

آنالیزهای شیمیایی

جهت تعیین محتوای عصاره‌های پلی ساکاریدی آنالیزهای شیمیایی تعیین کربوهیدرات کل با روش فنول- اسید سولفوریک انجام شد (Dubois et al., 1956). برای تعیین سولفات از روش ژلاتین-کلریدباریم استفاده شد (Lloyd et al., 1960). مقدار پروتئین کل با روش Lowry تعیین شد (Lowry et al., 1951). تعیین مقدار یورونیک اسید با استفاده از هیدروکسی دی فنیل صورت گرفت (Bitter & Muir, 1962).

طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR)

طیف FTIR پلی ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج شده با استفاده از دستگاه FTIR اسپکتروفتومتر (IRTracer-100، شیمادزو) در گستره $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ و با تفکیک پذیری 4 cm^{-1} تعیین گردید (Jridi et al., 2018).

غیرفعال کردن رادیکال آزاد DPPH

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های آزاد پایدار ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH) صورت پذیرفت (Guo et al., 2014). بدین منظور ۲ میلی گرم بر میلی لیتر از پلی ساکاریدهای سولفات‌ها به ۲ میلی لیتر از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به مدت یک دقیقه تکان داده

$$FC = (i \text{ fv} / t \text{ sv}) \times 100 \quad (۵)$$

در اینجا $i \text{ fv}$ حجم اولیه کف و $t \text{ sv}$ حجم نهایی سوسپانسیون بود.

پایداری کف پس از ۳۰ دقیقه با فرمول زیر محاسبه شد.

$$FS = (f \text{ fv} / t \text{ sv}) \times 100 \quad (۶)$$

که در فرمول بالا $f \text{ fv}$ حجم نهایی کف پس از ۳۰ دقیقه بوده و $t \text{ sv}$ حجم اولیه کف می‌باشد.

تجزیه تحلیل آماری داده‌ها

برای طراحی آزمایشات از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۲ انجام شد. برای مقایسه کلی پارامترها همچنین از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن (در سطح ۵ درصد) سپس برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۶ استفاده شد.

نتایج و بحث

آنالیز شیمیایی پلی‌ساکارید سولفات استخراج شده

نتایج آنالیز شیمیایی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلا در جدول ۱ نمایش داده شده است. بازده استخراج $0.2 \pm 0.03\%$ بود. مقدار بازده پلی‌ساکارید استخراج شده از صدف *Solen marginatus* در مطالعه Souissi و همکاران (۲۰۱۹) $0.53 \pm 0.03\%$ بود (Souissi et al., 2019). در مطالعه Jridi و همکاران (۲۰۱۹) که به استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفات از قسمت پوست و ماهیچه ماهی مرکب پرداختند گزارش کردند که درصد استخراج از قسمت پوست و عضله به ترتیب $1/6$ و $8/6\%$ بود (Jridi et al., 2019). مقدار کربوهیدرات و پروتئین نمونه بدست آمده نزدیک به مقادیر به‌دست آمده در مطالعات Jridi و همکاران (۲۰۱۹) و Souissi و همکاران (۲۰۱۹) بود (Souissi et al., 2019; Jridi et al., 2019). همین روال نیز برای مقادیر سولفات و یورونیک اسید مشاهده شد. محققان بیان کردند که عامل اصلی اختلاف در مقدار پلی‌ساکاریدهای سولفات از منابع مختلف نوع منبعی است که برای استخراج مورد استفاده قرار می‌گیرد. این منابع علاوه بر درصد پلی‌ساکارید سولفات می‌توانند در سایر اجزای شیمیایی نیز متفاوت باشند. در مطالعه‌ای دیگر این موضوع مشخص شد که علاوه بر تاثیر کلیدی نوع منبع مورد استفاده برای استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفات، روش استخراج و خالص سازی این ترکیبات بر خواص شیمیایی و ترکیبات شیمیایی پلی-ساکارید استخراج شده تاثیر دارد (Alboofetileh et al., 2019).

گرم از نمونه مخلوط شد. این محلول در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس به این محلول $2/5$ میلی‌لیتر اسید تری کلرو استیک 10% اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در 3000 rpm سانتریفوژ شد. در ادامه $2/5$ میلی‌لیتر آب و $0/5$ میلی‌لیتر کلرید آهن (FeCl_3) 1% به $2/5$ میلی‌لیتر از مخلوط اضافه شد. سپس این محلول در دمای ثابتی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شده تا در آن ایجاد رنگ صورت بپذیرد. بعد از این مدت جذب نمونه‌ها در 700 نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسید تانیک در غلظت‌های صفر تا 250 میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. قدرت شلاته‌کنندگی آهن بر حسب میلی‌گرم اسید تانیک بر گرم پودر باقی‌مانده‌های حاصل از فراوری خشک شده بیان شد. از اسید آسکوربیک به‌عنوان استاندارد برای مقایسه استفاده شد (Chew et al., 2008).

$$\text{Metal chelating activity (\%)} = \frac{[(\text{ODC} + \text{ODB} - \text{ODS}) / \text{ODC}] \times 100}{\quad} \quad (۳)$$

که در فرمول بالا ODC، ODB و ODS به ترتیب جذب نمونه شاهد، جذب نمونه بلانک (کنترل مثبت که حاوی محلول رادیکال بوده و به جای پلی‌ساکارید آب مقطر استفاده شد) و جذب نمونه واکنش است.

خواص امولسیفایری

خواص امولسیفایری پلی‌ساکاریدهای سولفات استخراج شده از طریق توانایی آنها برای تثبیت چند ترکیب آبریز مورد بررسی قرار گرفت. محلول پلی‌ساکارید با نسب وزنی- حجمی ۱، ۵ و 10% با هر کدام از ترکیبات آبریز ترکیب شده و با همزن مغناطیسی مدل MS200 با سرعت 300 rpm به مدت ۲ دقیقه کاملاً هم زده شد. پس از ۲۴ ساعت شاخص امولسیفایری (E24) از طریق فرمول زیر محاسبه شد.

$$E24 = (\text{He} / \text{Ht}) \times 100 \quad (۴)$$

که در فرمول بالا He بیانگر ارتفاع امولسیون و Ht بیانگر ارتفاع کل محلول می‌باشد. ترکیبات آبریز مورد استفاده شامل روغن سویا و روغن آفتابگردان بودند (Gomaa et al., 2018).

خصوصیات کف‌کنندگی

مقدار 150 میلی‌لیتر از محلول‌های ۱، ۵ و 10% وزنی- حجمی پلی‌ساکاریدهای سولفات به استفاده از هموژنایزر پروب‌دار مدل KTG و با سرعت 9000 دور بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه هموژن شد. خواص کف‌کنندگی آن‌ها بعد از ۳۰ ثانیه با فرمول زیر محاسبه شد (Sciarini et al., 2009).

جدول ۱- آنالیز شیمیایی پلی ساکارید سولفات استخراج شده

Table 1- Chemical analysis of extracted sulfated polysaccharide

یورونیک اسید (%)	سولفات (%)	کربوهیدرات (%)	پروتئین (%)	بازده استخراج (%)
Uronic acid (%)	Sulfate (%)	Carbohydrate (%)	Protein (%)	Extraction yield (%)
3.86± 0.42	6.54± 0.77	57.03± 2.56	7.78± 0.43	3.23± 0.02

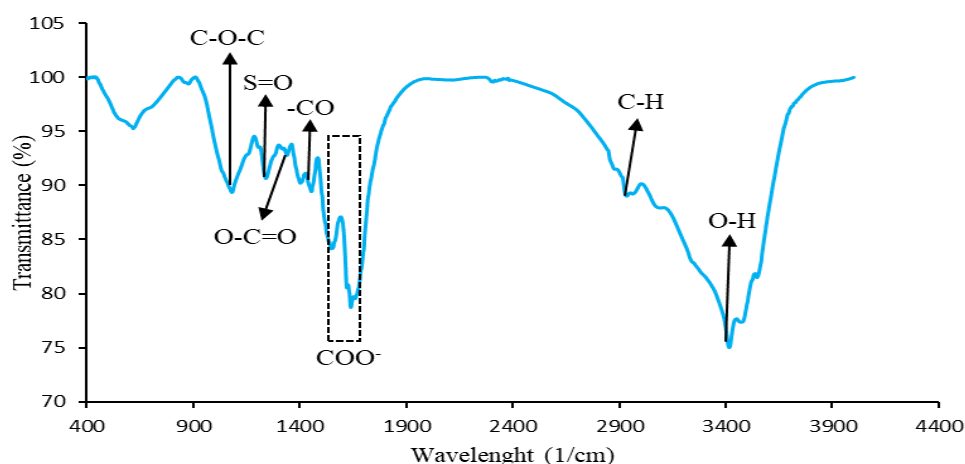
تعداد تکرار آزمایشات ۳ بار بود. اعداد بر اساس میانگین $\pm$ انحراف از معیار بیان شده‌اند.

The experiments were repeated 3 times. The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) پلی ساکارید استخراج شده

نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز پلی ساکاریدهای سولفات به دست آمده در محدوده 4000 تا 400 cm^{-1} در شکل ۱ نمایش داده شده‌اند. همانطوری که از شکل‌ها پیداست تفاوت معنی‌داری در جابه‌جایی پیک‌ها مشاهده نشده است و مشابه هستند. با این حال پیک پهن در ناحیه بین 3350 تا 3450 cm^{-1} مربوط به گروه OH و باند ضعیف ناحیه 2900 cm^{-1} مربوط به گروه عاملی C-H می‌باشد (Souissi et al., 2019; Alboofetileh et al., 2018).

1480 تا 1640 cm^{-1} مربوط به گروه عاملی COO^- است (Souissi et al., 2019). باندهای خمشی سولفات S=O در ناحیه 1245 cm^{-1} ظهور پیدا کرد (Jridi et al., 2019). پیک‌های ظاهر شده در ناحیه 1385 و 1450 cm^{-1} به ترتیب مربوط به باند کششی O-C=O و ارتعاش کششی CO در گروه COOH است (Jridi et al., 2019). باند ناحیه 1077 cm^{-1} مربوط به باند ارتعاشی C-O-C است (Shen et al., 2019).



شکل ۱- طیف FTIR پلی ساکارید سولفات استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان
Fig. 1. FTIR spectrum of sulfated polysaccharide extracted from rainbow trout skin

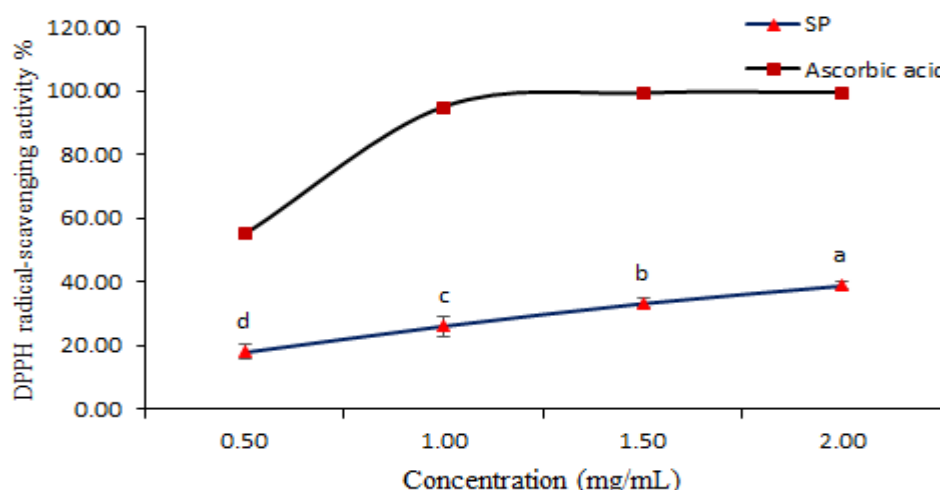
(Souissi et al., 2019). در این تست، ترکیبات زیست‌فعال مانند پلی ساکارید، پروتئین و لیپید توسط هیدروژن اهداءکننده می‌توانند با اهدای الکترون به رادیکال آزاد DPPH ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خود را نشان دهند (Souissi et al., 2019; Jridi et al., 2019). نتایج مطالعه حاضر هم راستا با نتایج به دست آمده در مطالعه Souissi و همکاران (۲۰۱۹) بود، که در آن مطالعه محققین به استخراج و بررسی خواص مختلف پلی ساکارید سولفات استخراج شده صدف (Solen marginatus) پرداختند (Souissi et al., 2019). نتایج آنها نشان داد که پس از غلظت ۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر روند افزایشی خاصیت

غیرفعال کردن رادیکال آزاد (DPPH) پلی ساکارید سولفات استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

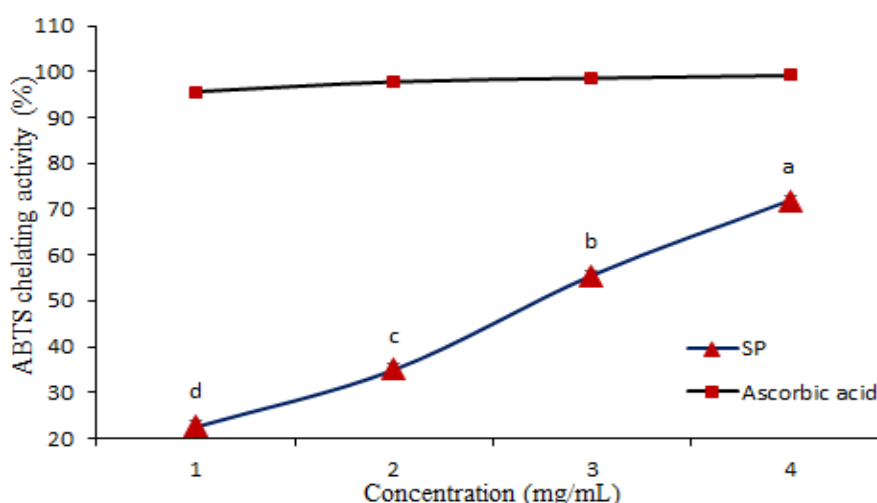
همانطور که از شکل ۲ پیداست یک روند افزایشی و معنی‌دار در غلظت‌های مختلف مورد استفاده برای این آزمایش مشاهده شد ($p < 0.05$) که بالاترین قدرت خنثی‌کنندگی پلی ساکاریدهای سولفات به دست آمده در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. تست رادیکال DPPH یکی از تست‌های آنتی‌اکسیدانی معمولی است که بر اساس رادیکال آزاد پایدار است که در این تست حداکثر جذب در ۵۱۷ نانومتر نشان داده خواهد شد (Jridi et al., Rjeibi et al., 2019).

همسو با نتایج حاضر بود (Jridi et al., 2019). جالب توجه است که محققین ویژگی مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH پلی‌ساکارید سولفات را با محتوای سولفات، نسبت مولی محتوای سولفات به فوکوز و وزن مولکولی مرتبط دانسته‌اند (Alboofetileh et al., 2019; Bhuyar et al., 2020).

ضداکسیدانی بر علیه رادیکال‌های آزاد DPPH متوقف شده و یک روند ثابت شکل گرفت که با افزایش بیشتر غلظت درصد خنثی‌کنندگی به بالاتر از ۶۰٪ نرسید. Jridi و همکاران (۲۰۱۹) به استخراج و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای سولفات از پوست و گوشت ماهی مرکب پرداختند که نتایج تست DPPH آنها



شکل ۲- نمودار آنالیز خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) پلی‌ساکارید سولفات استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان
Fig. 2. Analysis diagram of DPPH radical-scavenging activity of sulfated polysaccharide extracted from the skin of rainbow trout

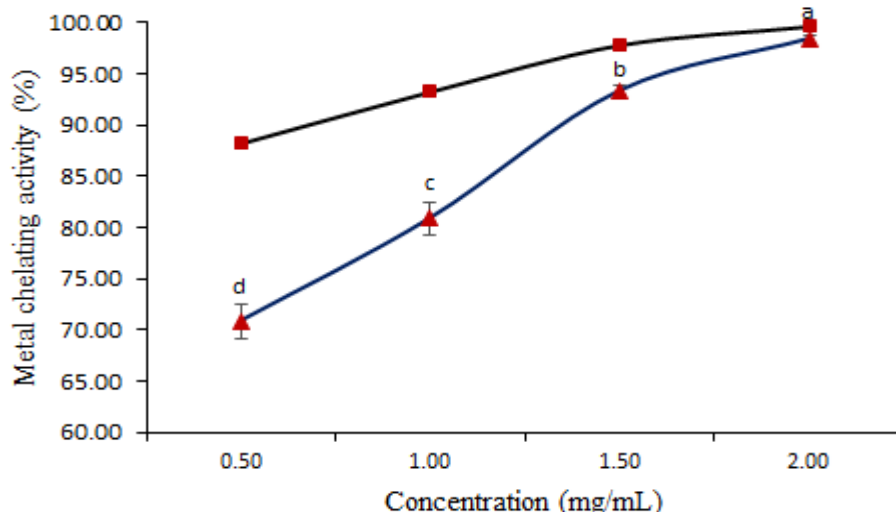


شکل ۳- نمودار آنالیز تست ABTS پلی‌ساکارید سولفات استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان
Fig. 3. Analysis diagram of %ABTS Chelating Activity of sulfated polysaccharide extracted from the skin of rainbow trout

گسترده‌ای برای ترکیبات چربی دوست و آبدوست دارد (Li & Wang, 2016). همانطور که از شکل ۳ پیداست یک روند افزایشی وابسته به غلظت قابل مشاهده است که بالاترین درصد شلاته‌کنندگی رادیکال ABTS در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آب مقطر دیده شد ($p < 0.05$). بر اساس مطالعات گذشته مشخص شده است که فعالیت شلاته‌کنندگی رادیکال ABTS پلی‌ساکاریدها می‌تواند به عوامل

شلاته‌کنندگی رادیکال ABTS پلی‌ساکارید سولفات استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان رادیکال ABTS یک رادیکال پایدار مصنوعی بوده که به دلیل حساسیت بالا برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف بکار می‌رود. این روش بر مبنای احیاء رادیکال کاتیون ($ABTS^{+}$) بوده که جذب بالایی در ۷۳۴ نانومتر دارد، همچنین این روش کاربرد

ارزیابی قدرت احیاکنندگی، توانایی الکترون‌دهندگی یک ترکیب را نشان می‌دهد. در این ارزیابی، اغلب میزان احیاکنندگی آهن III به عنوان نشانگر این توانایی استفاده می‌شود. اگر ترکیبی این ویژگی را داشته باشد، باعث کاهش ترکیبات حد واسطه اکسید شده طی مراحل پراکسیداسیون لیپید می‌شود. به این ترتیب باعث شکستن زنجیره این واکنش شده و می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان اولیه و ثانویه عمل کند، همچنین سنجش قدرت احیاکنندگی با استفاده از احیا آهن (III) به آهن (II) انجام می‌شود (Pan et al., 2019).



شکل ۴- نمودار فعالیت شلاته‌کنندگی یون‌های آهن پلی ساکارید سولفات‌ها استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان
Fig. 4. Diagram of metal chelating activity of sulfated polysaccharide extracted from the skin of rainbow trout.

مربک پرداخته شده بود محققین اذعان کردند که محتوای سولفات موجود در پلی ساکارید تاثیر بسیار مهمی در احیاءکنندگی یون‌های آن دارد (Jridi et al., 2019). علاوه بر مقدار سولفات پلی ساکاریدهای استخراج شده مشخص شده که حضور گالاکتورونیک اسید نقش مهمی در خواص ضد اکسیدانی پلی ساکاریدها دارد (Chang et al., 2010).

فعالیت کف‌کنندگی و پایداری کف پلی ساکارید سولفات‌ها استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

تشکیل کف و پایداری آن در بسیاری از صنایع نظیر صنایع غذایی و شیمیایی بسیار حائز اهمیت است به همین دلیل در صنعت به دنبال یافتن ترکیبات طبیعی با این خاصیت هستند. به طور کلی تعریف کف عبارت است از انتشار فاز پراکنده (معمولا هوا) به یک فاز پیوسته که ویژگی‌های کف تشکیل شده در مواد غذایی توسط پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها می‌تواند نقش مهمی در تکنولوژی مواد غذایی به عنوان عوامل کفزا ایجاد کنند (Li et al., 2019; Chen et al., 2019).

مختلفی از قبیل وزن مولکولی (Li & Wang, 2016)، مقدار سولفات (Khan et al., 2019) مرتبط باشد. در همین راستا نیز به این موضوع اشاره شده است که روش‌های استخراج این ترکیبات بر خواص شلاته‌کنندگی رادیکال ABTS نمونه‌ها تاثیر بسیار مهمی دارد که این تاثیر را به حضور مقادیر مختلف اجزای شیمیایی موجود در پلی ساکارید و میزان تخلیص این ترکیبات نسبت داده‌اند (Grina et al., 2020).

فعالیت شلاته‌کنندگی یون‌های فروزین پلی ساکارید سولفات‌ها استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

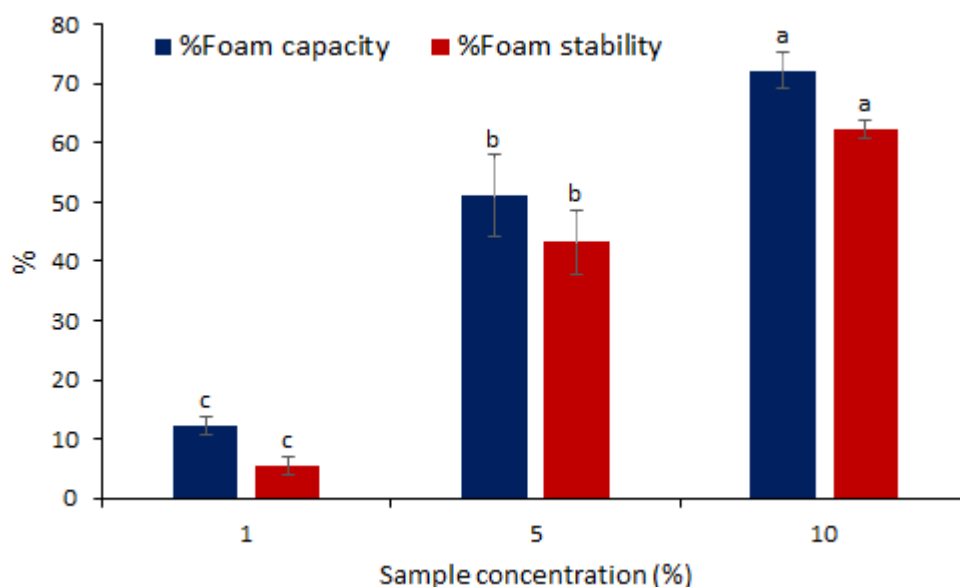
نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که قدرت احیاءکنندگی یون‌های فروزین وابسته به دوز استفاده شده برای پلی ساکاریدهای سولفات‌ها بود به صورتی که با افزایش غلظت نمونه‌ها مقدار این خواص افزایش پیدا کرد و بالاترین مقدار آن در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر آب مقطر بود و همچنین اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها مشاهده شد ($p < 0.05$). این نتایج هم‌راستا و همسو با نتایج به دست آمده در مطالعات Hamzaoui و همکاران (۲۰۲۰) بود که در آن مطالعه محققین به بررسی خواص ضد اکسیدانی و کارکردی پلی ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج شده از گیاه آبی *Chaetomorpha linum* پرداختند. بر اساس مطالعات گسترده‌ای که به بررسی خواص احیاءکنندگی پلی ساکاریدهای سولفات‌ها انجام شده این موضوع بخوبی مشخص شده است که خواص احیاءکنندگی این ترکیبات با افزایش وزن مولکولی افزایش می‌یابد

(Soua et al., Hamzaoui et al., 2020; Qi et al., 2005)

؛ (2020). در مطالعه‌ای که به بررسی خواص ضد اکسیدانی پلی ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج شده از پوست و گوشت ماهی

(۲۰۲۰) است (Romdhane et al., 2017; Souza et al., 2020). در مطالعه Zhu و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد که بالاترین ویژگی کف‌کنندگی و پایداری کف در پلی‌ساکارید استخراج شده به ترتیب ۹۲٪ و ۸۰٪ بود که اندکی بالاتر از نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بود، همچنین بیان کردند که بالا بودن این ویژگی‌ها به بالا بودن محتوای پروتئین پلی‌ساکاریدها نسبت دادند (Zhu et al., 2017). در مطالعه Ghribi و همکاران (۲۰۱۵) بالاترین خواص کف‌کنندگی و پایداری کف پلی‌ساکارید استخراج شده از chickpea به ترتیب ۹۱/۱۶٪ و ۷۹/۸۲٪ بود. با توجه به ویژگی خوب کف‌کنندگی و پایداری کف ایجاد شده توسط پلی‌ساکاریدهای استخراج شده می‌توان پیشنهاد داد که این پلی‌ساکاریدها قابلیت کاربرد صنعتی را در صنایع غذایی دارا هستند (Ghribi et al., 2015).

پلی‌ساکاریدها از اجزایی هستند که کاربردهای گسترده‌ای به عنوان عوامل کف‌زا در صنایع مختلف دارا هستند (Trigui et al., 2018). همانطوریکه از شکل ۵ پیداست یک روند افزایشی با افزایش غلظت پلی‌ساکارید سولفات استخراج شده بدست آمده است که به تناسب آن نیز پایداری کف ایجاد شده روند افزایشی در ایجاد کف نشان داده است ($p < 0.05$). غلظت ۱۰٪ پلی‌ساکارید سولفات استفاده شده بالاترین درصد کف‌کنندگی (۷۲/۲۲٪) و پایداری کف (۶۲/۲۲٪) را از خود نشان داده است. دلایل این نتایج را می‌توان به بهبود ویسکوزیته محلول‌های ایجاد شده توسط پلی‌ساکاریدهای سولفات نسبت داد، در واقع می‌توان این استدلال را بیان کرد که حضور پلی‌ساکاریدها در غلظت‌های بالاتر باعث پایداری ارتباط بین سطح کف تولید شده و محلول زیر آن شده است که این نتایج همراستا و همسو با گزارشات Romdhane و همکاران (۲۰۱۷) و Souza و همکاران



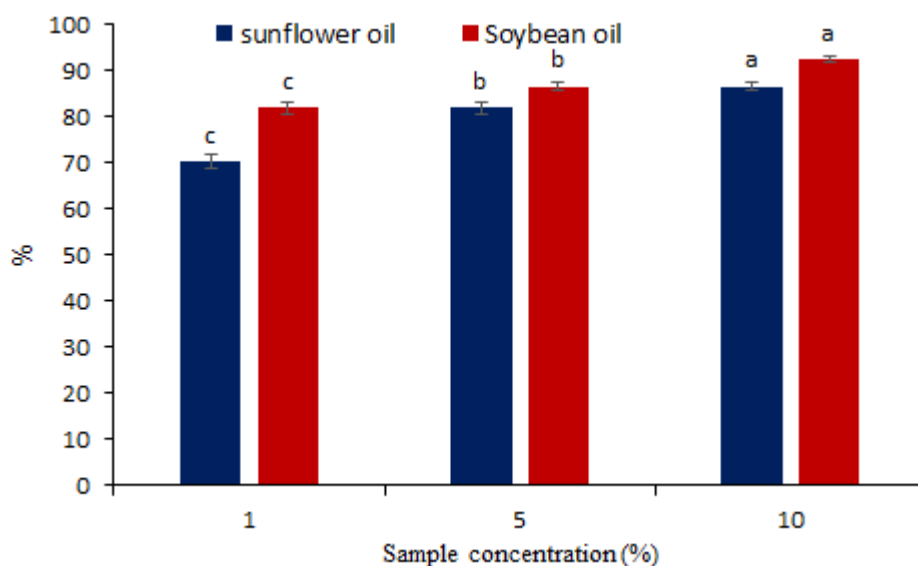
شکل ۵- نمودار فعالیت کف‌کنندگی و پایداری کف پلی‌ساکارید سولفات استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان
Fig. 5. Chart of foaming activity and foam stability of sulfated polysaccharide extracted from the skin of rainbow trout

آفتابگردان و روغن سویا به منظور بررسی خواص امولسیون‌کنندگی پلی‌ساکارید سولفات به دست آمده در غلظت‌های مختلف استفاده شد. در تمام غلظت‌های استفاده شده علی‌رغم اختلاف بسیار کم اما خواص امولسیون‌کنندگی برای روغن سویا بالاتر بود ($p < 0.05$). Leroux و همکاران (۲۰۰۳) که به بررسی خواص امولسیون‌کنندگی پکتین پرداخته بود بیان کردند که توانایی امولسیون‌کنندگی پلی‌ساکاریدها به دلیل حضور مقادیر بسیار ناچیز پروتئین است که به طور کوالانی به ساختار پلی‌ساکاریدها متصل شده است (Leroux et al., 2003). که این امر با توجه به حضور ۷/۷۸٪ پروتئین در پلی‌ساکارید

فعالیت امولسیون‌کنندگی پلی‌ساکارید سولفات استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان
امولسیون‌ها سامانه‌های متشکل از دو مایع (معمولاً آب و روغن) غیرقابل امتزاج هستند که از نظر ترمودینامیکی ناپایدار می‌باشند (Wang et al., 2019). این سامانه‌ها اساس بسیاری از محصولات غذایی را تشکیل می‌دهند. مولکول‌های زیستی نظیر پروتئین‌ها و برخی از پلی‌ساکاریدها به عنوان امولسیون‌کننده و پایدارکننده‌های طبیعی برای پایداری سامانه‌های امولسیون مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Saravana et al., 2016). در مطالعه حاضر از دو نوع روغن

دلیل این امر وجود مقادیر زیادی پلی ساکارید است که می تواند سطح مشترک روغن-آب را کاملاً اشباع کند و در نتیجه باعث پوشش سطح بالاتر می شود (Zhu et al., 2017).

سولفات‌ها استخراج شده قابل توجه است. روند افزایشی ظرفیت امولسیون کنندگی که متناسب با افزایش غلظت نمونه‌ها مشاهده شد مشابه نتایج به دست آمده با مطالعه Zhu و همکاران (۲۰۱۷) بود که



شکل ۶- نمودار فعالیت امولسیون کنندگی پلی ساکارید سولفات‌ها استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان
Fig. 6. Chart of emulsifying activity of sulfated polysaccharide extracted from the skin of rainbow trout

می‌شود. با توجه به نتایج ارائه شده در قسمت‌های مختلف می‌توان این ادعا را کرد که پلی ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پتانسیل کاربرد به عنوان مکمل‌های تغذیه‌ای ضد اکسیدانی و عوامل امولسیون ساز و کف کننده در صنایع غذایی را دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی و معنوی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور (شماره طرح ۹۹۰۰۳۹۳۲) و دانشگاه تربیت مدرس (IG-39804) کمال تشکر و قدردانی را دارند.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر پلی ساکارید سولفات‌ها از قسمت پوست باقی مانده‌های خام حاصل از فرآوری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با محتوای بالایی از کربوهیدرات و سولفات به وسیله رسوب دهی با اتانول استخراج شد. پلی ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج شده پتانسیل آنتی اکسیدانی بالایی را نشان دادند و می‌توانند از انتشار واکنش‌های زنجیره ای رادیکال‌های آزاد از طریق اهدای هیدروژن (الکترون) جلوگیری کنند. پلی ساکارید سولفات‌ها خواص کف کنندگی و امولسیون کنندگی بسیار خوبی را نیز از خود نشان دادند. به طور کلی می‌توان اذعان کرد که خواص مختلفی که در پلی ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج شده مشاهده می‌شود به حضور مقادیر مختلف کربوهیدرات، سولفات، یورونیک اسید و پروتئین مربوط

منابع

1. Alboofetileh, M., Rezaei, M., & Tabarsa, M. (2018). Enzyme-assisted extraction of *Nizamuddinina zanardinii* for the recovery of sulfated polysaccharides with anticancer and immune-enhancing activities. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1651-7>
2. Alboofetileh, M., Rezaei, M., Tabarsa, M., & You, S. (2019). Bioactivities of *Nizamuddinina zanardinii* sulfated polysaccharides extracted by enzyme, ultrasound and enzyme-ultrasound methods. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03584-1>
3. Arima, K., Fujita, H., Toita, R., Imazu-Okada, A., Tsutsumishita-Nakai, N., Takeda, N., Nakao, Y., Wang, H., Kawano, M., Matsushita, K., Tanaka, H., Morimoto, S., Nakamura, A., Kitagaki, M., Hieda, Y., Hatto, R., Watanabe, A., Yumura, T., Okuhara, T., ... Tamura, J. I. (2013). Amounts and compositional analysis of

- glycosaminoglycans in the tissue of fish. *Carbohydrate Research*, 366, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.11.010>
4. Bitter, T., & Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 4, Issue 4, pp. 330–334). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90095-7)
5. Borazjani, N. J., Tabarsa, M., You, S. G., & Rezaei, M. (2017). Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.128>
6. Chang, S. C., Hsu, B. Y., & Chen, B. H. (2010). Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.06.010>
7. Chen, G., Fang, C., Chen, X., Wang, Z., Liu, M., & Kan, J. (2019). High-pressure ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Mentha haplocalyx*: Structure, functional and biological activities. *Industrial Crops and Products*, 130(October 2018), 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.086>
8. Chew, K. K., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Khoo, M. Z., Wan Aida, W. M., & Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*, 18(2), 571–578.
9. Cho, C. W., Han, C. ji, Rhee, Y. K., Lee, Y. C., Shin, K. S., Shin, J. S., Lee, K. T., & Hong, H. Do. (2015). Cheonggukjang polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.010>
10. Dong, X., Duan, X., Sun, Z., Zhang, X., Li, C., Yang, S., Ren, B., Zheng, S., & Dionysiou, D. D. (2019). Structural characterization and antioxidant activities of a water soluble polysaccharide isolated from *Glycyrrhiza glabra*. “Applied Catalysis B, Environmental,” 118214. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.118214>
11. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
12. FAO (2018). Yearbook of Fishery Statistics, Statistics and Information Service, FAO Fisheries and Aquaculture Department. Viale delle Terme di Caracalla 00153, Rome: Food and Aquaculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/fishery/statistics/en> .
13. Ghribi, A. M., Sila, A., Gafsi, I. M., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., ... & Besbes, S. (2015). Structural, functional, and ACE inhibitory properties of water-soluble polysaccharides from chickpea flours. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.037>
14. Gilar, M., Yu, Y. Q., Ahn, J., Xie, H., Han, H., Ying, W., & Qian, X. (2011). Characterization of glycoprotein digests with hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 417(1), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.028>
15. Gomaa, M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Abdel-Gawad, K. M. (2018). Use of seaweed and filamentous fungus derived polysaccharides in the development of alginate-chitosan edible films containing fucoidan: Study of moisture sorption, polyphenol release and antioxidant properties. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 82). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.056>
16. Grina, F., Ullah, Z., Kaplaner, E., Moujahid, A., Eddoha, R., Nasser, B., Terzioğlu, P., Yilmaz, M. A., Ertaş, A., Öztürk, M., & Essamadi, A. (2020). In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical fingerprints of five Moroccan seaweeds. *South African Journal of Botany*, 128, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.021>
17. Guo, L., Zhu, W., Xu, F., Liu, M., Xie, Y., & Zhang, J. (2014). Optimized ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Cyclina sinensis* and evaluation of antioxidant activities in vitro. *CYTA- Journal of Food*, 12(1), 32–39. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.785982>
18. Hamzaoui, A., Ghariani, M., Sellem, I., Hamdi, M., Feki, A., Jaballi, I., Nasri, M., & Amara, I. Ben. (2020). Extraction, characterization and biological properties of polysaccharide derived from green seaweed “*Chaetomorpha linum*” and its potential application in Tunisian beef sausages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1156–1168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.009>
19. Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
20. Jridi, M., Mezhoudi, M., Abdelhedi, O., Boughriba, S., Elfalleh, W., Souissi, N., Nasri, R., & Nasri, M. (2018). Bioactive potential and structural characterization of sulfated polysaccharides from Bullet tuna (*Auxis Rochei*) by-products. *Carbohydrate Polymers*, 194(April), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.038>

21. Jridi, M., Nasri, R., Marzougui, Z., Abdelhedi, O., Hamdi, M., & Nasri, M. (2019). Characterization and assessment of antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides extracted from cuttlefish skin and muscle. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1221–1228. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.170>
22. Khan, B. M., Qiu, H. M., Wang, X. F., Liu, Z. Y., Zhang, J. Y., Guo, Y. J., Chen, W. Z., Liu, Y., & Cheong, K. L. (2019). Physicochemical characterization of *Gracilaria chouae* sulfated polysaccharides and their antioxidant potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.055>
23. Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 455–462. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00027-4)
24. Li, H., Tao, Y., Zhao, P., Zhi, D., Gao, X., Zhao, X., & Li, M. (2019). Effect of ultrasound-assisted extraction on physicochemical properties and TLR2-affinity binding of the polysaccharides from *Pholiota nameko*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.177>
25. Li, X., & Wang, L. (2016). Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.060>
26. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
27. Loyd, A. G., Dogson, K. S., Price, R. G., & Rose, F. A. (1960). Polysaccharide Sulphates. *Biochem Biophys Acta*, 46(2961).
28. Odeleye, T., White, W. L., & Lu, J. (2019). Extraction techniques and potential health benefits of bioactive compounds from marine molluscs: a review. *Food & Function*. <https://doi.org/10.1039/c9fo00172g>
29. P. Bhuyar, M.H. Rahim, S. Sundararaju, G.P. Maniam, N. G. (2020). Antioxidant and antibacterial activity of red seaweed; *Kappaphycus alvarezii* against pathogenic bacteria. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 5(1), 47–58. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2020.01.0>
30. Pan, X. Y., Wang, Y. M., Li, L., Chi, C. F., & Wang, B. (2019). Four antioxidant peptides from protein hydrolysate of red stingray (*dasyatis akajei*) cartilages: Isolation, identification, and in vitro activity evaluation. *Marine Drugs*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/md17050263>
31. Pomin, V. H., & Mulloy, B. (2018). Glycosaminoglycans and proteoglycans. *Pharmaceuticals*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ph11010027>
32. Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao, Z., & Xing, R. (2005). Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 17(6), 527–534. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9003-9>
33. Rjeibi, I., Hentati, F., Feriani, A., Hfaiedh, N., Delattre, C., Michaud, P., & Pierre, G. (2019). Novel antioxidant, anti- α -amylase, anti-inflammatory and antinociceptive water-soluble polysaccharides from the aerial part of *Nitraria retusa*. *Foods*, 9(1), 28. <https://doi.org/10.3390/foods9010028>
34. Romdhane, M. Ben, Haddar, A., Ghazala, I., Jeddou, K. Ben, Helbert, C. B., & Ellouz-Chaabouni, S. (2017). Optimization of polysaccharides extraction from watermelon rinds: Structure, functional and biological activities. *Food Chemistry*, 216, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.056>
35. Saravana, P. S., Cho, Y. J., Park, Y. B., Woo, H. C., & Chun, B. S. (2016). Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction. *Carbohydrate Polymers*, 153, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.014>
36. Sciarini, L. S., Maldonado, F., Ribotta, P. D., Pérez, G. T., & León, A. E. (2009). Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.011>
37. Shahidi, F. (2012). Nutraceuticals, functional foods and dietary supplements in health and disease. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(SUPPL.1), 226–230.
38. Shen, Q., Zhang, C., Jia, W., Qin, X., Cui, Z., & Mo, H. (2019). Co-production of chondroitin sulfate and peptide from lique fied chicken sternal cartilage by hot-pressure. *Carbohydrate Polymers*, 222(April), 115015. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115015>
39. Soua, L., Koubaa, M., Barba, F. J., Fakhfakh, J., Ghamgui, H. K., & Chaabouni, S. E. (2020). Water-Soluble Polysaccharides from *Ephedra alata* Stems: Structural characterization, functional properties, and antioxidant activity. *Molecules*, 25(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25092210>
40. Souissi, N., Boughriba, S., Abdelhedi, O., Hamdi, M., Jridi, M., Li, S., & Nasri, M. (2019a). Extraction, structural characterization, and thermal and biomedical properties of sulfated polysaccharides from razor clam *Solen marginatus*. *RSC Advances*, 9(20), 11538–11551. <https://doi.org/10.1039/C9RA00959K>

41. Trigui, I., Yaich, H., Sila, A., Cheikh-Rouhou, S., Bougatef, A., Blecker, C., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2018). Physicochemical properties of water-soluble polysaccharides from black cumin seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 937–946. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.202>
42. Wang, Y., Ghosh, S., & Nickerson, M. T. (2019). Effect of pH on the formation of electrostatic complexes between lentil protein isolate and a range of anionic polysaccharides, and their resulting emulsifying properties. *Food Chemistry*, 298(June), 125023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125023>
43. Xie, J. H., Tang, W., Jin, M. L., Li, J. E., & Xie, M. Y. (2016). Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: Structures and functionalities. *Food Hydrocolloids*, 60(235), 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.030>
44. Xu, S. Y., Huang, X., & Cheong, K. L. (2017a). Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. *Marine Drugs*, 15(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/md15120388>
45. Yang, L., & Zhang, L. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.015>
46. Ye, Q., Georges, N., & Selomulya, C. (2018). Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science and Technology*, 78(January), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>
47. Yu, Y., Shen, M., Song, Q., & Xie, J. (2018). Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate Polymers*, 183(235), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.009>
48. Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., & Prentice, C. (2018). Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview. *Marine Biotechnology*, 20(2), 118–130. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9799-3>
49. Zhu, D. Y., Ma, Y. L., Wang, C. H., Wang, H., Ren, Y. F., Zhang, J. G., Thakur, K., & Wei, Z. J. (2017). Insights into physicochemical and functional properties of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1192–1201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.164>



Extraction of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from common carp scales (*Cyprinus carpio*) and determination of their characteristics

Marjan Zargar¹, Bahareh Shabanpour^{*2} , Parastou Pourashouri³, Ebrahim Zabihi Neyshabouri⁴

Received: 2021.12.13

Revised: 2022.02.14

Accepted: 2022.02.19

Available Online: 2022.02.19

How to cite this article:

Zargar, M., Shabanpour, B., Pourashouri, P., Zabihi Neyshabouri, E. (2022). Extraction of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from common carp scales (*Cyprinus carpio*) and determination of their characteristics. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 740-749.

Abstract

Introduction: Collagen is the most abundant and important structural protein in the connective tissue of animals, the production of which is of great importance in the fields of medicine, cosmetics and food. Due to religious restrictions as well as common diseases between livestock and humans, today collagen extraction has turned to other sources, especially aquatic sources. Therefore, the aim of this study was to extract collagen by conventional acidic and enzymatic methods from common carp scales and determine its characteristics in order to make optimal use of this waste to produce valuable products and find alternatives to collagen obtained from land animals.

Material and Method: Acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) were extracted from common carp scales (*Cyprinus carpio*) and their properties were determined. Common carp scales were prepared with the use of 0.5 M acetic acid and pepsin enzyme. Finally, the extracted collagens were lyophilized and after calculating the extraction efficiencies, their characteristics were determined by electrophoresis tests, UV spectroscopy, X-ray diffraction and isoelectric point determination.

Results and Discussion: The results showed that the extraction efficiencies of ASC and PSC were 1.9% and 2.96% (based on dry weight), respectively, which means digestion with pepsin could increase collagen efficiency up to 1.54 times. The results of SDS-PAGE analysis showed that both ASC and PSC are type I collagen and are composed of α_1 , α_2 and β in the $(\alpha_1)_2\alpha_2$ chain structure; the isoelectric point of collagens was in the pH range of 5-6. The maximum absorption peak of the UV spectrum of collagen was observed at 235 nm. Although pepsin enzyme (1% dry weight of scales) increases efficiency without significant changes in collagen native structure, but its use for mass production of type I collagen in Iran is not recommended unless self-sufficiency and reduction of pepsin price achieved, while collagen extraction by acidic method is very simple and research to design a production line for this method is recommended. Common carp scales have the potential to be used as an alternative source of collagen in the food and health-pharmaceutical industries. These results can provide a solution to control the waste of the aquatic processing industry in creating environmental pollution, as well as producing a high value-added product from common carp scales.

Keywords: Scales, Common carp (*Cyprinus carpio*), Acid-soluble collagen, Pepsin-soluble collagen, Waste.

1, 2 and 3. Ph.D. Student, Professor and Associate professor, respectively, Fisheries Products Processing Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4. Associate Professor, Department of Pharmacology, Babol University of Medical Sciences, Iran.

(*Corresponding Author Email: b_shabanpour@yahoo.com)

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74164.1121

مقاله علمی-پژوهشی

استخراج کلاژن‌های محلول در اسید و محلول در پپسین از فلس کپور

معمولی (Cyprinus carpio) و تعیین ویژگی‌های آنها

مرجان زرگر^۱ - بهاره شعبان‌پور^{۲*} - پرستو پورعاشوری^۳ - ابراهیم ذیحی نیشابوری^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

چکیده

کلاژن فراوان‌ترین و مهم‌ترین پروتئین ساختاری در بافت همبند جانوران است که تولید آن اهمیت زیادی در زمینه‌های پزشکی و دارویی، آرایشی-بهداشتی و غذایی دارد. با توجه به محدودیت‌های مذهبی و نیز بیماری‌های مشترک بین دام و انسان، امروزه استحصال کلاژن به دیگر منابع و به‌ویژه منابع آبزی معطوف شده است. بنابراین هدف این مطالعه استخراج کلاژن به دو شیوه مرسوم اسیدی و آنزیمی از فلس کپور معمولی و تعیین ویژگی‌های آن به‌منظور استفاده بهینه از این پسماند برای تولید محصولات با ارزش افزوده و یافتن جایگزینی برای کلاژن به‌دست آمده از حیوانات خشکی می‌باشد. کلاژن محلول در اسید (Acid soluble collagen) و کلاژن محلول در پپسین (Pepsin soluble collagen) از فلس کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) استخراج و خواص آنها تعیین شد. فلس‌های کپور معمولی پس از آماده‌سازی به کمک اسیداستیک ۵٪/۰ مولار و آنزیم پپسین تحت استخراج قرار گرفته در نهایت کلاژن استخراج شده، لیوفیلیزه شد و پس از محاسبه بازده استخراج، ویژگی‌های آن با استفاده از آزمون‌های الکتروفورز، طیف‌سنجی فرابنفش، پراش اشعه ایکس و تعیین نقطه ایزوالکتریک مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد که بازده استخراج ASC و PSC به‌ترتیب ۱/۹٪ و ۲/۹۶٪ (بر مبنای وزن خشک) بود یعنی هضم با پپسین می‌تواند تا ۱/۵۴ برابر باعث افزایش بازده کلاژن شود. نتایج آنالیز SDS-PAGE نشان داد هر دو ASC و PSC به‌عنوان کلاژن نوع I بوده و از α_1 ، α_2 و β در ساختار زنجیره‌ای α_1 و α_2 تشکیل شده‌اند؛ نقطه ایزوالکتریک کلاژن‌ها در دامنه pH ۵-۶ قرار داشت. حداکثر پیک جذب طیف فرابنفش کلاژن‌های به‌دست آمده در ۲۳۵ نانومتر مشاهده شد. اگرچه آنزیم پپسین (۱٪ وزن خشک فلس) باعث افزایش بازده بدون تغییر معنی‌دار در ساختار کلاژن می‌شود ولی استفاده از آن برای تولید انبوه کلاژن نوع I در ایران تا رسیدن به خودکفایی و کاهش قیمت پپسین، توصیه نمی‌شود این درحالیست که استخراج کلاژن به روش اسیدی بسیار ساده بوده و تحقیق جهت طراحی خط تولید برای این روش پیشنهاد می‌شود. فلس کپور معمولی این پتانسیل را دارد که به‌عنوان منبع جایگزین کلاژن در صنایع غذایی و بهداشتی-دارویی به کار رود. این نتایج می‌تواند علاوه بر تولید محصول با ارزش افزوده بالا از فلس کپور معمولی، راهکاری برای کنترل ضایعات صنعت فرآوری آبزیان در ایجاد آلودگی محیط زیست ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: فلس، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، کلاژن محلول در اسید، کلاژن محلول در پپسین، ضایعات

مقدمه

ترکیبات معدنی (هیدروکسی آپاتیت، کلسیم فسفات و غیره) است. کلاژن فراوان‌ترین پروتئین در مهره‌داران است که حدود ۳۰٪ از کل پروتئین‌های آنها را تشکیل می‌دهد و مهم‌ترین پروتئین ساختاری در بافت همبند جانوران است که در پوست، رباط‌ها، تاندون‌ها و بسیاری از ساختارهای دیگر بدن وجود دارد (Ali et al., 2018). کلاژن، از سه زنجیره پلی‌پپتیدی مارپیچ به نام زنجیره‌های آلفا تشکیل شده است. از زمان کشف کلاژن II توسط Miller و Matukas (۱۹۶۹)، ۲۹ نوع

در برخی از کشورهای آسیایی، آفریقایی و اروپایی، کپور ماهی‌ها، رایج‌ترین ماهیان آب شیرین هستند. فلس ماهی فراورده جانی در فرآوری ماهی است که مستقیماً باعث آلودگی محیط می‌شوند. این درحالیست که فلس ماهی حاوی مقدار زیادی از مواد ارزشمند از جمله حدود ۴۰ الی ۵۵ درصد مواد آلی (کلاژن، چربی، لسیتین، اسکروپروتئین، ویتامین‌های مختلف و غیره) و حدود ۷ تا ۲۵ درصد

* نویسنده مسئول: Email: b_shabanpour@yahoo.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74164.1121

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، گروه عمل‌آوری فراورده‌های شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران.

کلاژن کشف شده است که تنوع این کلاژن‌ها به دلیل تفاوت در ماهیت پلی‌پپتیدهای تشکیل دهنده آنهاست (Richard-Blum, 2011; Li et al., 2018). فراوان‌ترین کلاژن، نوع I است که بیش از ۹۰٪ کلاژن موجود در بدن از این نوع است (Lim et al., 2019). در ماهی، کلاژن نوع I بیشتر در پوست و استخوان وجود دارد (Sliman & Sadok, 2018).

کلاژن در تشکیل بافت، اندام‌ها و فعالیت‌های گوناگون سلولی نقش مهمی دارد. از آنجایی که با افزایش سن، تولید کلاژن در بدن کاهش می‌یابد، از آن در رژیم غذایی و نوشیدنی‌ها و نیز به عنوان مکمل دارویی برای جبران این پروتئین ارزشمند استفاده می‌شود (Hashim et al., 2015). در قرن بیست و یکم، فناوری مواد غذایی برای تولید غذاهایی که می‌تواند به عنوان منبع تغذیه مفید باشد و همچنین خواص عملکردی خوبی که تأثیر مثبتی بر بدن انسان داشته باشد، توسعه یافته است (Said, 2020). در صنایع غذایی، از کلاژن به عنوان فیلم‌ها یا پوشش‌های خوراکی به صورت بسته‌بندی، غوطه‌وری عمیق، رومال کردن یا اسپری کردن بر روی مواد غذایی استفاده می‌شود. کلاژن هیدرولیز شده، یک ماده نویدبخش در صنایع غذایی به ویژه برای تولید نوشیدنی‌ها است. ژلاتین یکی از با ارزش‌ترین پروتئین‌ها در صنایع غذایی و زیست پزشکی است که از هیدرولیز پروتئین‌های کلاژن به دست می‌آید (Said, 2020). مصرف کلاژن می‌تواند موها را ضخیم کند، سبب بهبود اختلالات ناخن مانند ناخن‌های شکننده، افزایش اندازه فیبرهای کلاژن در تاندون آشیل، تحریک تراکم فیبروبلاست و تقویت تشکیل فیبرهای کلاژن در پوست و غیره شود (Chai et al., 2010). کلاژن، به دلیل دارا بودن خواص بسیار عالی مانند عدم ایمنی‌زایی، زیست‌سازگاری^۱ و زیست تخریب‌پذیری^۲، یک ماده بیولوژیکی مهم در زمینه‌های پزشکی و دارویی است (Chen et al., 2009).

امکان اینکه کلاژن به عنوان ماده اصلی تشکیل دهنده محصولات غذایی، آرایشی بهداشتی و زیست‌دارویی باشد، به امکان تأمین مواد اولیه به مدت طولانی و استخراج پایدار آن بستگی دارد (Krishnan and Perumal, 2013). منابع اصلی تأمین کلاژن، دم موش، پوست گاو و پوست خوک هستند، اما عواملی مانند افزایش قیمت مواد اولیه، مسائل شرعی و بیماری‌های مشترک بین دام و انسان، در کلاژن به دست آمده از موجودات خشکی، توجه محققین را به استحصال کلاژن از موجودات آبی معطوف کرده است (Nomura and Kitozome, 2002; Khong et al., 2018). در این خصوص، پسماندهای ماهی منبع مناسبی محسوب می‌شوند. میزان صید و آبی‌پروری در سال ۱۳۹۵، ۱۰۹۳۷۱۹ تن بوده است که از این مقدار، ۴۵۹۵۲۱ تن تولید از طریق آبی‌پروری و ۲۰۱۰۹۷ تن تولید از طریق پرورش ماهیان

گرمابی بوده است (Iran Statistical Yearbook, 2016-2017). در صنعت فرآوری ماهی، بخش بزرگی از پسماندها تولید می‌شود، که به طور معمول ۷۰٪-۵۰٪ از مواد اولیه را پوست، استخوان‌ها، فلس، احشاء و سر تشکیل می‌دهد. مدیریت این به اصطلاح "زباله‌ها" کاری دشوار می‌باشد، به طوری که گاهی مشکلات جدی برای محیط زیست به وجود می‌آورد. به طور کلی این مواد برای تولید خوراک دام یا کودهای کم‌ارزش استفاده می‌شوند. با توجه به اینکه حدود ۳۰٪ یا بیشتر این پسماندها کلاژن نوع I است، اخیراً توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند (Chai et al., 2010). کلاژن‌های استخراج شده از ماهی با مزایای بسیار، زیست‌مواد نویدبخشی در آینده این کشور هستند. تحقیقات بسیاری درباره استخراج کلاژن از ماهی وجود دارد؛ اما مطالعه استخراج کلاژن از ماهی هنوز هم به دلیل تفاوت در تنوع زیستی که تأثیر بسیاری بر ترکیب مولکولی و اسید آمینه کلاژن ماهی دارد، مورد توجه می‌باشد. تغییرات در خصوصیات فیزیکی پروتئین و مقدار اسیدهای آمینه در کلاژن استخراج شده از گونه‌های مختلف ماهی به شدت وابسته به دمای محیط پیرامون است. بنابراین، مطالعه در مورد تهیه و تعیین ویژگی‌های کلاژن ماهی برای یافتن محصولات جدید کلاژنی به منظور جایگزینی محصولات به دست آمده از کلاژن حیوانات خشکی، ضروری است (Chinh et al., 2019). بعضی روش‌ها برای استخراج کلاژن از پوست یا فلس ماهی استفاده شده است، به عنوان مثال، روش شیمیایی با استفاده از مواد قلیایی و اسیدی، روش بیوشیمیایی با استفاده از اسید و آنزیم یا اسید و میکروارگانیزم‌ها و استخراج با آب. با این حال، استخراج کلاژن محلول در اسید و کلاژن محلول در پیپسین دو روش رایج‌تر هستند. بنابراین هدف از این مطالعه استخراج کلاژن از فلس کپور معمولی به دو روش مرسوم اسیدی و آنزیمی و تعیین خصوصیات آن بود. از آنجاکه ماهی کپور یکی از گونه‌های اصلی موجود در صنعت پرورش ماهیان آب شیرین در ایران است، فلس ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) برای مطالعه انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک، اسید استیک، کلرید سدیم و هیدروکسی متیل آمینومتان (Tris-HCl) از برند Merk (آلمان)، پیپسین از برند Titrachem (چین)، سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، N,N,N,N-ترامتیل اتیلن دی‌آمین (TEMED)، کوماسی بلو (R-250) و نشانگرهای وزن مولکولی پروتئین (۹-۱۸۰ کیلودالتون) از برند Excel Band (تایوان) و همگی از گرید آزمایشگاهی بودند.

جمع‌آوری نمونه

فلس ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۱/۵ - ۱ کیلوگرم در فروردین ماه سال ۱۴۰۰ به صورت تازه از بازار محلی ماهی‌فروشان در قائمشهر جمع‌آوری شده و در مدت ۱ ساعت به مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل منتقل و تا زمان مصرف در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آماده‌سازی

در ابتدا فلس‌ها با آب شهری سرد شسته شده با قیچی به اندازه‌های 2×2 میلی‌متر مربع برش داده شدند. پس از ۲۴ ساعت هم زنی در سود ۰/۱ مولار با نسبت ۲۰:۱ و شستشو با آب مقطر، به مدت ۱ ساعت در کلریدریک اسید ۰/۶ مولار، با نسبت ۱۰:۱ تحت همزنی با همزن مغناطیسی (Lab Tech، کره) مداوم قرار گرفته و مجدداً شستشو با آب مقطر انجام گرفت (Pal et al., 2016).

استخراج کلاژن محلول در اسید

فلس‌های آماده شده، به مدت ۴۸ ساعت در اسید استیک ۰/۵ مولار با نسبت فلس به محلول ۱ به ۱۵ تحت همزنی قرار گرفتند. سپس مخلوط از صافی رد شد و فلس‌ها از محلول جدا شدند. با افزودن کلریدسدیم به محلول به دست آمده در حضور Tris-HCl (هیدروکسی متیل آمینومتان) ۰/۵ مولار برای به دست آوردن غلظت ۲/۵ مولار نمک‌زنی شد (با تعدیل pH تا ۷/۵؛ سپس محلول با ۲۰۰۰g و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Sigma، آلمان) شد. ماده رسوب یافته در حداقل حجم از اسید استیک ۰/۵ مولار حل شد. محلول نهایی در ۲۰ حجم از اسید استیک ۰/۱ مولار و سپس ۲۰ حجم آب مقطر تحت دیالیز (غشای دیالیز ۱۲ کیلودالتون، سیگما، امریکا) قرار گرفت. تمام مراحل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. کلاژن استخراج شده، با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Beta2-Christ، 8LD Plus، آلمان) لیوفیلیزه شد. کلاژن به دست آمده کلاژن محلول در اسید (ASC) بود که تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Matmaroh et al., 2011).

استخراج کلاژن محلول در پیپسین

فلس‌های آماده شده، به مدت ۴۸ ساعت در اسید استیک ۰/۵ مولار حاوی ۱٪ پیپسین (Titrachem, 9001-75-6، چین) (به نسبت وزن خشک فلس) با نسبت فلس به محلول ۱ به ۱۵ تحت همزنی قرار گرفتند. سپس مخلوط از صافی رد شد و و فلس‌ها از محلول جدا شدند.

با افزودن کلریدسدیم به محلول به دست آمده در حضور Tris-HCl (هیدروکسی متیل آمینومتان) ۰/۵ مولار (pH ۷/۵) برای به دست آوردن غلظت ۲/۵ مولار نمک‌زنی شد؛ سپس محلول با ۲۰۰۰g و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Sigma، آلمان) شد. ماده رسوب یافته در حداقل حجم از اسید استیک ۰/۵ مولار حل شد. محلول نهایی در ۲۰ حجم از اسید استیک ۰/۱ مولار و سپس ۲۰ حجم آب مقطر تحت دیالیز (غشای دیالیز ۱۲ کیلودالتون، سیگما، امریکا) قرار گرفت. تمام مراحل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. کلاژن استخراج شده، با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Christ، Beta2-8LD Plus، آلمان) لیوفیلیزه شد. کلاژن به دست آمده با کمک آنزیم پیپسین کلاژن محلول پیپسین (PSC) نامیده شده تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Matmaroh et al., 2011).

محاسبه بازده کلاژن خالص

بازده کلاژن به صورت درصد و بر مبنای وزن خشک، با رابطه ذیل محاسبه شد (Khong et al., 2018).

$$(1) \quad 100 \times (\text{وزن خشک فلس مورد استفاده} / \text{وزن خشک کلاژن لیوفیلیزه}) = \text{درصد بازده (بر پایه وزن خشک)}$$

الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)^۱

الگوهای پروتئینی نمونه‌های کلاژن، با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید سدیم سولفات دودسیل طبق روش Laemmli (۱۹۷۰) تعیین شدند. نمونه‌ها روی ژل‌های پلی‌اکریل آمید متشکل از یک ژل جداکننده ۷/۵٪ و ژل ردیف کننده ۴٪ بارگذاری شدند و با استفاده از یک دستگاه الکتروفورز (مینی پروتئین II، Biorad، انگلستان) در جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر تحت الکتروفورز قرار گرفتند. نشانگر پروتئینی (۹-۱۸۰ کیلودالتون، Excel Band، تایوان) برای تخمین وزن مولکولی پروتئین‌ها استفاده شد (Laemmli et al., 1970).

تعیین نقطه ایزوالکتریک^۲

نمونه‌های کلاژن در اسید استیک ۰/۵ مولار حل شدند تا غلظت نهایی ۰/۵ به دست آید. پتانسیل Zeta (ζ) محلول کلاژن با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Malvern، سری زتاسایزر، انگلستان) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. pH محلول‌های کلاژن در دامنه ۳-۸ تنظیم شد.

2 The isoelectric point (IEP)

1 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDSPAGE)

Ka در ۳۵ کیلوولت و ۲۰ میلی آمپر با طول موج $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ به دست آمدند. اسکن در دامنه $2\theta = 5^\circ - 30^\circ$ با گام 0.02° درجه ای و سرعت اسکن 2° درجه در دقیقه انجام شد (Alves et al., 2017).

نتایج و بحث بازده

پیوند $(-C=N-)$ بین مولکول های کلاژن را می توان در شرایط اسیدی از بین برد، به این ترتیب ساختار محکم کلاژن سست تر شده و استخراج کلاژن تسهیل می شود. با این حال، غلظت زیاد اسید ممکن است منجر به تخریب کلاژن شده و ساختار طبیعی آن را از بین ببرد. بنابراین، در این کار غلظت کمتری از اسید استیک (0.5 مولار) استفاده شد (Wu et al., 2019).

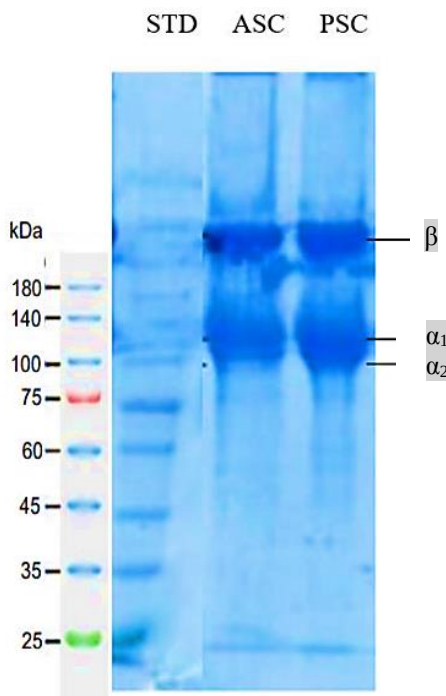
پتانسیل زتا (ζ) در هر درجه افزایش pH مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Khong et al., 2018).

طیف سنجی فرابنفش

این آزمایش با استفاده از اسپکتروفتومتر (Jenway، انگلستان) در گستره 200 تا 400 نانومتر انجام شد. نمونه ها با انحلال کلاژن در محلول اسید استیک 0.5 مولار با نسبت نمونه به محلول 1 به 1000 (وزنی/حجمی) آماده سازی شدند (Li et al., 2018).

پراش پرتو ایکس

الگوهای پراش اشعه ایکس (XRD) کلاژن لیوفیلیزه، توسط یک دیفراکتومتر اشعه ایکس (Jenway، انگلستان) با استفاده از تابش Cu-



شکل ۱- الگوی الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید دودسیل سولفات برای نمونه های کلاژن فلس کپور معمولی. STD: نشانگر مولکولی پروتئین، ASC: کلاژن محلول در اسید، PSC: کلاژن محلول در پپسین

Fig. 1. Polyacrylamide dodecyl sulfate gel electrophoresis pattern for common carp scale collagen samples. STD: protein molecular marker, ASC: acid-soluble collagen, PSC: pepsin-soluble collagen

(al., 2010) گزارش شد. ساختار کلاژن به دلیل یکسری پیوندهای متقابل کووالانسی بین مولکولی، بسیار پایدار است و به طور کلی در آب، اسید یا قلیای رقیق، محلول نمکی خنثی و حلال های آلی معمول، نامحلول است. با این حال، مطالعات نشان داده اند که توالی تکراری اسید آمینه Gly-X-Y تشکیل شده در پایانه C- و پایانه N- زنجیره پپتیدی وجود ندارد که نشان دهنده یک منطقه غیرمارپیچی است

بازده کلاژن های ASC و PSC استخراج شده از فلس کپور معمولی به ترتیب $1/91\%$ و $2/96\%$ (براساس وزن خشک) بود. نتیجه نشان داد استفاده از 1% پپسین برای استخراج بازده کلاژن را $1/54$ برابر افزایش داد. بازده استخراج برای کلاژن های ASC و PSC در فلس بزماهی طلایی خال دار به ترتیب $0/46\%$ و $1/20\%$ (Matmaroh et al., 2011) و در فلس کپورنقره ای $0/86\%$ و $2/32\%$ (Zhang et

دلیل منابع مختلف فلس ماهی باشد (Panda et al., 2014). در مقایسه با ASC، وزن مولکولی زنجیره‌های α_1 و α_2 در PSC اندکی کمتر بود اما شدت زنجیره‌های α بیشتر بود. پپسین توانست تا حدی منطقه تلوپپتیدی را شکافته، منجر به کوتاه شدن طول زنجیره و کاهش وزن مولکولی آن شود (Ali et al., 2018). لازم به ذکر است که در الگوی پروتئینی، ممکن است که زنجیره α_3 وجود داشته باشد اما به دلیل اینکه این زنجیره دارای وزن مولکولی برابر با زنجیره α_1 است، بنابراین نمی‌توان آن را تشخیص داد. علاوه بر این، زنجیره β نیز در کلاژن‌های استخراج شده وجود داشت که دارای وزن مولکولی بالاتر از زنجیره‌های α و پیوندهای عرضی زیاد می‌باشند نشان می‌دهد که کلاژن‌های استخراج شده از اتصالات متقابل مولکولی بالایی برخوردار هستند (Ali et al., 2018; Matmaroh et al., 2011).

نقطه ایزوالکتریک

مقدار pHی که در آن بارهای مثبت و منفی روی یک مولکول پروتئین در یک سیستم آبی برابر هستند یا در آن بار خالص پروتئین صفر است، نقطه ایزوالکتریک (pI) نامیده می‌شود (Barzideh et al., 2013).

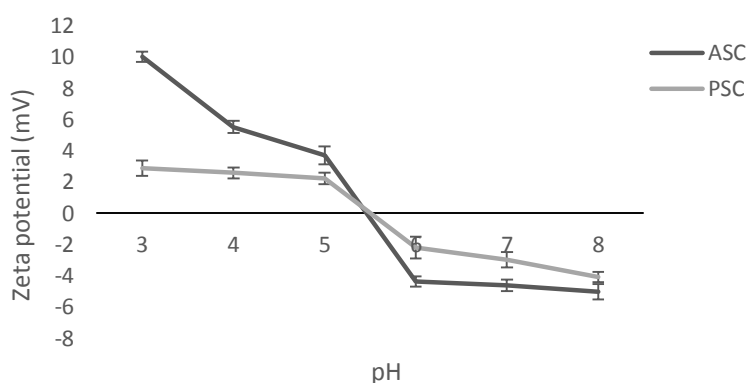
بار سطحی کلاژن‌های ASC و PSC در pHهای مختلف با استفاده از تحلیل گر پتانسیل زتا اندازه‌گیری شد. هر دو کلاژن در pH اسیدی (۳ تا ۵/۵) دارای بار خالص مثبت بودند. با افزایش مقادیر pH، بار کلاژن کاهش یافته و نقطه ایزوالکتریک (pI) هر دو کلاژن، در محدوده pH معادل ۶-۵ برآورد شد که منطقه اسیدی می‌باشد. علت این امر را می‌توان به محتوای بالای گروه کربوکسیل اسیدهای آمینه اسیدی مانند گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید نسبت داد. نقطه ایزوالکتریک PSC اندکی بالاتر از ASC بود.

(Shamansky et al., 1989). پپسین قادر است در چنین منطقه غیرماریپی عمل کرده و پیوندهای کووالانسی و غیرکووالانسی که ساختار کلاژن را تثبیت می‌کنند را از بین ببرد و از این رو انحلال کلاژن را بهبود ببخشد؛ بنابراین پپسین می‌تواند برای استخراج کلاژن از فلس استفاده شود (Hong et al., 2018). تفاوت کارایی پپسین در استخراج کلاژن بستگی به گونه ماهی، ترکیب و پیکربندی کلاژن، مقدار پپسین مورد استفاده و غیره دارد (Matmaroh et al., 2011).

الگوی پروتئینی SDS-PAGE

الگوی پروتئینی نمونه‌های کلاژن محلول در اسید (ASC) و کلاژن محلول در آنزیم پپسین (PSC) استخراج شده از فلس کپور معمولی با استفاده از آزمون SDS-PAGE تعیین شد که در شکل ۱ آمده است. با توجه به الگوهای پروتئینی، کلاژن‌های به‌دست آمده از فلس کپور معمولی از زنجیره‌های α (α_1 و α_2) و β تشکیل شده‌اند که از نظر وزن مولکولی با کلاژن فلس بزماهی طلایی خال‌دار (Matmaroh et al., 2011) و کلاژن فلس کپور ماهی چینی (Panda et al., 2014) که به‌عنوان کلاژن نوع I با دو زنجیره α (α_1)₂(α_2) دسته‌بندی شدند، مشابهت داشت.

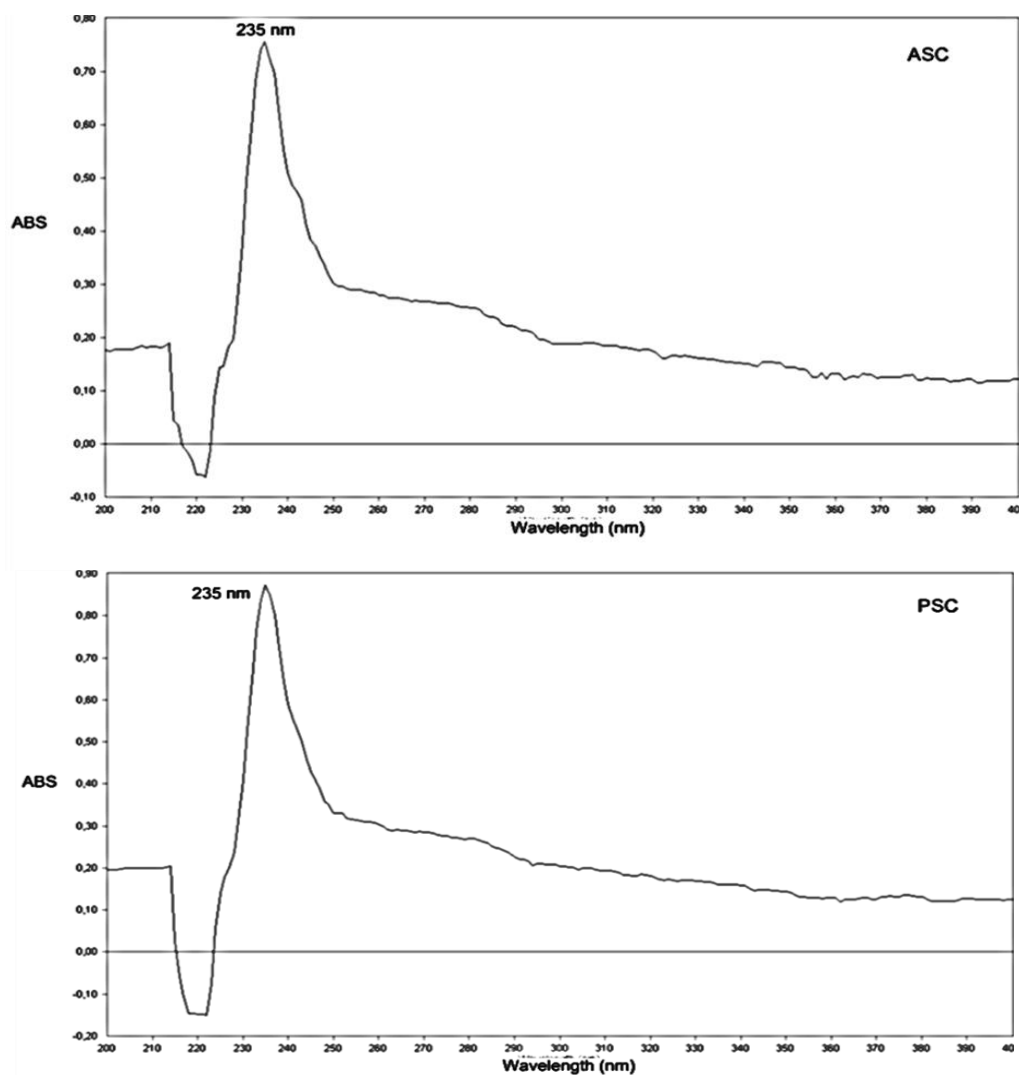
با توجه به پهنای باند، نسبت زنجیره‌های α_1 به α_2 به صورت ۱:۲ (دو زنجیره α_1 و یک زنجیره α_2) بود از این رو آنها به‌عنوان کلاژن نوع I طبقه‌بندی شدند که مهمترین کلاژن در پوست، فلس و استخوان ماهی است (Chinh et al., 2019; Matmaroh et al., 2011). کلاژن استخراج شده به روش اسیدی از فلس گونه‌های مختلف مانند ساردین، سیم دریایی سرخ، باس دریایی ژاپنی (Nagai et al., 2004)، روهو و کاتلا (Pati and Dhara, 2010) نیز به‌عنوان کلاژن نوع I بودند. تفاوت وزن مولکولی زنجیره‌های آلفا در کلاژن ممکن است به



شکل ۲- پتانسیل زتا در نمونه‌های کلاژن محلول در اسید (ASC) و کلاژن محلول در پپسین (PSC) فلس کپور معمولی
Fig. 2. Zeta potential in acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) samples of common carp scales

این امر به احتمال زیاد به دلیل حذف برخی از اسیدهای آمینه در منطقه غیرمارپیچی کلاژن در PSC است (Ali et al., 2018; Barzideh et al., 2013). پپسین ممکن است ناحیه تلویپتیدی را شکافته و منجر به تفاوت در ترکیب اسید آمینه در زنجیره‌های α شود (Benjakul et al., 2010). نقطه ایزوالکتریک کلاژن برای عروس دریایی در pH معادل ۶/۶۴ (Barzideh et al., 2013)، برای کلاژن ASC و PSC از کپور طلایی در pH معادل ۶/۱۱ و ۶/۲۱ (Ali et al., 2018) متفاوت است.

این امر به احتمال زیاد به دلیل حذف برخی از اسیدهای آمینه در منطقه غیرمارپیچی کلاژن در PSC است (Ali et al., 2018; Barzideh et al., 2013). پپسین ممکن است ناحیه تلویپتیدی را شکافته و منجر به تفاوت در ترکیب اسید آمینه در زنجیره‌های α شود (Benjakul et al., 2010). نقطه ایزوالکتریک کلاژن برای عروس دریایی در pH معادل ۶/۶۴ (Barzideh et al., 2013)، برای کلاژن ASC و PSC از کپور طلایی در pH معادل ۶/۱۱ و ۶/۲۱ (Ali et al., 2018) متفاوت است.



شکل ۳- طیف فرابنفش نمونه‌های کلاژن فلس کپور معمولی (ASC: کلاژن محلول در اسید، PSC: کلاژن محلول در پپسین)

Fig. 3. Ultraviolet spectrum of common carp scale collagen samples (ASC: acid-soluble collagen, PSC: pepsin-soluble collagen)

طیف‌سنجی فرابنفش پروتئین‌ها زیست مولکول‌های درشتی هستند که از یک یا چند اسید آمینه تشکیل شده‌اند. حداکثر طول موج جذب اسیدهای آمینه معطر فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان به ترتیب در دامنه ۲۵۰ الی ۲۷۰، ۲۷۰ الی ۲۹۰ و ۲۸۰ الی ۳۰۰ نانومتر است. تحقیقات نشان داده است مولکول پروتئین در صورتی که حداکثر جذب را در دامنه ۲۱۰-۲۴۰ نانومتر نشان دهد، کلاژن می‌باشد (Wu et al., 2015; Yu et al., 2014). در طیف‌سنجی فرابنفش نمونه‌های کلاژن ASC و PSC

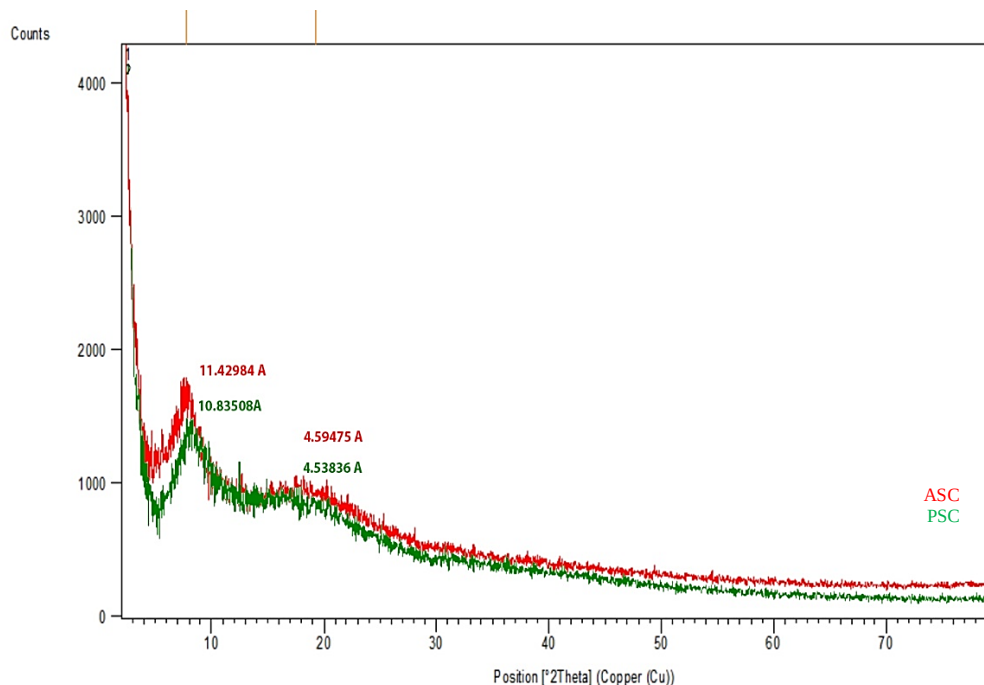
طیف‌سنجی فرابنفش پروتئین‌ها زیست مولکول‌های درشتی هستند که از یک یا چند اسید آمینه تشکیل شده‌اند. حداکثر طول موج جذب اسیدهای آمینه معطر فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان به ترتیب در دامنه ۲۵۰ الی ۲۷۰، ۲۷۰ الی ۲۹۰ و ۲۸۰ الی ۳۰۰ نانومتر است. تحقیقات نشان داده است مولکول پروتئین در صورتی که حداکثر جذب را در دامنه ۲۱۰-۲۴۰ نانومتر نشان دهد، کلاژن می‌باشد (Wu et al., 2015; Yu et al., 2014). در طیف‌سنجی فرابنفش نمونه‌های کلاژن ASC و PSC

کلاژن است و می‌تواند به‌عنوان یک ویژگی خاص دیده شود. نتایج به‌دست‌آمده از طیف اشعه ایکس کلاژن‌های لیوفیلیزه فلس ماهی کپور معمولی مطابق با نتایج کریستال‌های کلاژن لیوفیلیزه به‌دست آمده از فلس ماهی کپور (Zhang et al, 2011) و ماهی تیلاپیا نیل (El-Rashidy et al., 2015) بود. اولین و تیزترین پیک مربوط به ترکیب ماریپیچ سه گانه و فاصله بین زنجیره‌های مولکولی است. قله دوم مربوط به فاصله بین اسکلت‌ها است. زوایای پراش (۲θ) کلاژن محلول در اسید ۷/۷ و ۱۹ درجه و کلاژن محلول در پیپسین ۸/۲ و ۲۰ بود. حداقل مقادیر (d) فواصل مکرر، با استفاده از معادله براگ $d(\text{\AA}) = \lambda / 2 \sin \theta$ ($\lambda = 1.54 \text{\AA}$) محاسبه شد (Zhang et al, 2011). در کلاژن محلول در اسید، d مربوط به قله تیز ۱۱/۴۲ $\text{\AA}$ و برای قله پهن ۴/۵۹ $\text{\AA}$ و در کلاژن محلول در پیپسین ۱۰/۸۳ $\text{\AA}$ برای قله تیز و ۴/۵۳ $\text{\AA}$ برای قله پهن بود. این مقادیر با مقادیر گزارش شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۱) و نیز مقادیر گزارش شده توسط Alves و همکاران (۲۰۱۷) برای کلاژن نوع ۱ پوست قزل آلائی رنگین کمان و Elrashidy و همکاران (۲۰۱۵) برای کلاژن فلس تیلاپای نیل مطابقت داشت و تأییدکننده این مطلب بود که کلاژن به‌دست آمده از فلس کپور معمولی ساختار ماریپیچ سه گانه‌ای دارد (Zhang et al, 2011; El-Rashidy et al., 2015; Alves et al., 2017).

به‌دست آمده از فلس کپور معمولی، حداکثر پیک جذب در ۲۳۵ نانومتر بود (شکل ۳) که احتمالاً به‌دلیل باندهای پپتیدی گروه‌های C=O، CONH₂ و COOH در زنجیره‌های پلی‌پپتیدی کلاژن بود (Yu et al., 2014). در ۲۸۰ نانومتر جذب بسیار ضعیف برای کلاژن‌ها مشاهده شد که به‌دلیل جذب اسیدآمینه‌های آروماتیک بود. این نتایج در راستای یافته‌های Li و همکاران (۲۰۱۴) در کلاژن‌های فلس میوئی کروکر (۲۲۰ نانومتر) و Chinh و همکاران (۲۰۱۹) در فلس کپور آب‌های شیرین گرمسیری (۱۹۲ نانومتر) بود (Chinh et al., 2019, Li et al., 2018).

طیف‌سنجی پرتو ایکس

پراش اشعه ایکس اغلب برای ارزیابی ساختار کریستالی کلاژن، توزیع فیبریل و جهت‌گیری کلاژن در بافت‌های معدنی ماهی استفاده می‌شود (Zhang et al, 2011). شکل ۴ طیف اشعه ایکس کلاژن استخراج شده محلول در اسید (الف) و نیز کلاژن استخراج شده با استفاده از آنزیم پیپسین (ب) از فلس کپور معمولی را نشان می‌دهد. بین ساختارهای این دو کلاژن تفاوت خاصی قابل مشاهده نبود بدین معنی که آنزیم پیپسین، علیرغم افزایش بازده استخراج، تأثیری بر ساختار مولکول کلاژن نداشته است. الگوی پراش پرتو ایکس در هر دو کلاژن مشابه و دارای دو پیک مشخص بود. این دو پیک مشخصه مولکول



شکل ۴- پراش اشعه ایکس نمونه‌های کلاژن فلس کپور معمولی (ASC: کلاژن محلول در اسید، PSC: کلاژن محلول در پیپسین)

Fig 4- X-ray diffraction of common carp scale collagen samples (ASC: acid-soluble collagen, PSC: pepsin-soluble collagen)

نتیجه گیری

می شود ولی با توجه به قیمت بالای آن از یکسو و فراوانی فلس و دیگر ضایعات آبزیان به عنوان منبع اولیه تأمین کلاژن نوع I، استفاده از پیسین جهت تولید انبوه کلاژن نوع I در ایران تا رسیدن به خودکفایی و کاهش قیمت پیسین، توصیه نمی شود این درحالیست که استخراج کلاژن به روش اسیدی بسیار ساده بوده و تحقیق جهت طراحی خط تولید برای این روش توصیه می گردد. بنابراین فلس کپور معمولی این پتانسیل را دارد که یک منبع جایگزین برای تولید کلاژن نوع I جهت کاربرد در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی باشد. علاوه بر این، اطلاعات کلاژن فلس کپور معمولی به دست آمده در این مطالعه ممکن است یک پایه تئوری برای توسعه فرآوری ضایعات شیلاتی مربوط به فناوری بازیافت با هدف کاهش آلودگی محیط زیست و افزایش ارزش افزوده باشد.

در مطالعه حاضر، ASC و PSC از فلس های کپور معمولی به دو روش اسیدی و آنزیمی استخراج شدند. بازده ASC و PSC به ترتیب ۱/۹۱٪ و ۲/۹۶٪ بود. هضم با پیسین باعث افزایش تولید کلاژن تا ۱/۵۴ برابر شد. طیف فراینش نشان داد که پروتئین استخراج شده در هر دو روش، کلاژن است. پروفایل SDS-PAGE هر دو کلاژن، مشابه و تشکیل شده از α_1 ، α_2 و β بود که نشان داد که ASC و PSC به دست آمده از فلس کپور معمولی، کلاژن نوع I هستند. نقطه ایزوالکتریک کلاژن ها در دامنه pH ۵ الی ۶ به دست آمد. نتایج پراش اشعه ایکس نیز نشان دهنده حفظ ساختار مارپیچ سه گانه در کلاژن های استخراج شده با استفاده از اسید و نیز آنزیم پیسین بود. اگرچه آنزیم پیسین (۱٪ وزن خشک فلس) باعث افزایش بازده بدون تغییر معنی دار در ساختار کلاژن

منابع

1. Ali AMM, Benjakul S, Prodpran T and Kishimura H, (2018). Extraction and characterisation of collagen from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*), a processing by-product. Waste Biomass Valori 9: 783-791. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9841-0>
2. Ali AMM, Hideki K and Soottawat B, (2018). Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication. Process Biochemistry, 66: 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.003>
3. Alves AL, Marques ALP, Martins E, Silva TH and Reis RL, (2017). Cosmetic potential of marine fish skin collagen. Cosmetics 4: 39. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040039>
4. Barzideh, Z, Latiff AA, Gan CY, Benjakul S and Karim AA, (2013). Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (*Chrysaora sp.*). International Journal of Food Science and Technology. 49(6), 1490-1499. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12464>
5. Benjakul S, Thiansilakul Y, Visessanguan W, Roytrakul S, Kishimura H and Prodpran T, (2010). Extraction and characterisation of pepsin solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). Journal of the Science Food and Agriculture 90(1): 132-138. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3795>
6. Chai HJ, Li JH, Huang HN, Li TL, Chan YL, Shiao CY and Wu CJ, (2010). Effects of sizes and conformations of fish-scale collagen peptides on facial skin qualities and transdermal penetration efficiency. Journal of Biomedicine and Biotechnology. <https://doi.org/10.1155/2010/757301>
7. Chattopadhyay S and Raines RT, (2014). Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing. Biopolymers 101(8): 821-833. <https://doi.org/10.1002/bip.22486>
8. Chen Z, Wei B, Mo X, Lim CT, Ramakrishna S and Cui F, (2009). Mechanical properties of electro spun collagen-chitosan complex single fibers and membrane. Materials Science and Engineering C 29 (8): 2428-2435. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.07.006>
9. Chinh NT, Manh VQ, Trung VQ, Trang TDM, Hoang T, (2019). Characterization of collagen derived from tropical freshwater carp fish scale wastes and its amino acid sequence. Natural Product Communications 14(7).
10. Dermal Fillers, (2013). The Ageing Skin. Pharmaxchange. info. Retrieved on 2013-04-21.
11. El-Rashidy AA, Gad A, Abu-Hussein AE, Habib S, Badr NA and Hashem AA, (2015). Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. International Journal of Biological Macromolecules 79: 618-626. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.019>
12. Hashim P, Mohd Ridzwan MS, Bakar J and Hashim DM, (2015). Collagen in food and beverage industries. International Food Research Journal 22 (1): 1-8.
13. Hong H, Roy BC, Chalamaiah M, Bruce HL and Wu JP, (2018). Pretreatment with formic acid enhances the production of small peptides from highly cross-linked collagen of spent hens. Food Chemistry 258: 174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.036>
14. Khong NMH, Yusoff FMd, Jamilah B, Basria M, Maznaha I, Chana KW, Armaniana N and Nishikawad J, (2018). Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*)

- p>with increased physical-induced solubilization processes.
- Food Chemistry*
- 251: 41-50.
- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.083>
15. Krishnan S and Perumal P, (2013). Preparation and biomedical characterization of jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha*) collagen from southeast coast of India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5 (3).
 16. Laemmli UK, (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
 17. Li LY, Zhao YQ, He Y, Chi CF and Wang B, (2018). Physicochemical and antioxidant properties of acid and pepsin-soluble collagens from the scales of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Marine Drugs* 16: 394. <https://doi.org/10.3390/md16100394>
 18. Lim YS, Ok YJ, Hwang SY, Kwak JY and Yoon S, (2019). Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. *Marine Drugs* 17: 467. <https://doi.org/10.3390/md17080467>
 19. Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, Encarnacion AB and Kishimura H, (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry* 129(3): 1179-1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099>
 20. Miller EJ and Matukas VJ, (1969). Chick cartilage collagen: A new type of a1 chain not present in bone or skin of the species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 64: 1264-1268. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.4.1264>
 21. Nagai T, Izumi M and Ishii M, (2004). Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. *International Journal of Food Science and Technology* 39(3): 239-244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00777.x>
 22. Nomura Y and Kitozome N, (2002). Use of shark collagen for cell culture and zymography. *Bioscience Biotechnology, Biochemistry* 66 (12): 2673-2676. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2673>
 23. Pal P, Srivas PK, Dadhich P, Das B, Maity PP, Moulik D and Dhara S, (2016). Accelerating full thickness wound healing using collagen sponge of mrigal fish (*Cirrhinus cirrhosus*) scale origin. *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 1507-1518. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.032>
 24. Panda NN, Pramanik K and Sukla LB, (2014). Extraction and characterization of biocompatible hydroxyapatite from fresh water fish scales for tissue engineering scaffold. *Bioprocess Biosystem* 37: 433. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1009-0>
 25. Pati F, Adhikari B and Dhara S, (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology* 101(10): 3737-3742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.133>
 26. Ramshaw JA, Peng Y, Glattauer V and Werkmeister JA, (2009). Collagens as biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (1): S3-S8. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3415-4>
 27. Richard-Blum S, (2011). Collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3: a004978. DOI: [10.1101/cshperspect.a004978](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978)
 28. Slimane EB and Sadok S, (2018). Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. *Marine Drugs* 16: 211. <https://doi.org/10.3390/md16060211>
 29. Said MI, (2020). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 492, 012086. DOI: [10.1088/1755-1315/492/1/012086](https://doi.org/10.1088/1755-1315/492/1/012086)
 30. Wu J, Kong L, Zhang J and Chen W, (2019). Extraction and properties of acid-soluble collagen and pepsin-soluble collagen from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Scales: Prerequisite information for fishery processing waste reuse. *Polish Journal of Environmental Studies* 28(4): 2923-2930. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0264-z>
 31. Wu QQ, Li T, Wang B, Ding GF, (2015). Preparation and characterization of acid and pepsin-soluble collagens from scales of croceine and redlip croakers. *Food Science Biotechnology* 24: 2003-2010. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0264-z>
 32. Shamansky LM, Pratt D, Boisvenue RJ and Cox GN, (1989). Cuticle collagen genes of *haemonchus-contortus* and *caenorhabditis-elegans* are highly conserved. *Molecular and Biochemical Parasitology* 37 (1): 73. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90104-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90104-7)
 33. Yu D, Chi CF, Wang B, Ding GF and Li Z, 2014. Characterization of acid and pepsin soluble collagens from spine and skull of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines* 12: 712-720.
 34. Zhang J, Duan R, Ye C and Konno K, 2010. Isolation and characterization of collagens from scale of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Food Biochemistry* 34(6): 1343-1354. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00439.x>
 35. Zhang F, Wang A, Li Z, He S and Shao L, (2011). Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales. *Food Nutrient Science* 2: 818-823. DOI: [10.4236/fns.2011.28112](https://doi.org/10.4236/fns.2011.28112)



Effects of chia seed extract on chemical and sensory properties of sweet cream butter during refrigerated storage

Zahra Sadri Saeen¹, Mohammadreza Khani^{2*} , Vajihe Fadaei Noghani³

Received: 2021.12.27

Revised: 2022.01.17

Accepted: 2022.02.21

Available Online: 2022.02.21

How to cite this article:

Sadri Saeen, Z., Khani, M., Fadaei Noghani, V. (2022). Effects of chia seed extract on chemical and sensory properties of sweet cream butter during refrigerated storage. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5). 751-763.

Abstract

Introduction: Butter is a type of dairy product made of sweet cream or sour cream. It is a perishable food that can be spoiled due to chemical changes during storage. Rancidity is one of the main problems caused by lipolysis and oxidation of fatty acids, which cause off-flavor and reduce the nutritional quality of butter. By adding low concentrations of antioxidant compounds, autooxidation can be prevented or delayed. It is also possible to increase the shelf life of butter by adding antioxidants. However, the carcinogenic effect of some synthetic antioxidants and consumer preference has led manufacturers to use more natural antioxidants. Chia seeds contain significant amounts of protein, fat, carbohydrates, minerals, and vitamins. Moreover, many bioactive compounds with high antioxidant potential are found in chia seeds such as phenolic acids, flavonoids, tocopherols, and sterols. Therefore, the present study was conducted to investigate the effects of chia seed extract in sweet cream butter to improve its chemical and sensory properties during refrigeration storage.

Materials and Methods: For this purpose, the alcoholic extract of chia seed was prepared by adding chia seed powder to 70% ethanol (5% w/v) with stirring for 24 h, at room temperature. The filtered extracts were concentrated with a rotary evaporator. The concentrated mixture was dried in an oven at 40 °C and kept in an amber glass container in the refrigerator at 4 °C until the experiment was performed. Total phenolics content and antioxidant activity of chia seed extract were evaluated by the Folin–Ciocalteu colorimetric method using gallic acid as standard and for free radical scavenging ability by DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) method, respectively. Then, chia seed extract was added to butter with different percentages (0.05, 0.1, 0.25, and 0.5%) and its effects on chemical properties including acidity, acid value, peroxide value, and thiobarbituric acid were evaluated for two months at 15-day intervals in refrigerated storage. Also, sensory properties including color, odor, taste, texture, and overall acceptance of butter samples were assessed using 15 untrained evaluators based on a 5-point hedonic test as above conditions. The results were reported as means ± standard deviation and they were analyzed with analysis of variance using the software SPSS version 14. Statistical differences were analyzed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Results and Discussion: The results of total polyphenols content were 1108.78 ± 111.79 mg gallic acid per 100 g of extract and radical scavenging activity of chia seed extract in the concentration range of 4 to 20% was 35.17 ± 0.47 to $64.92 \pm 2.95\%$. Also, the efficient concentration (EC₅₀) of chia seed extract was 12.13 ± 0.59 mg/L in this study. It is known that the smaller the EC₅₀, it will be the greater the antioxidant or free radical scavenging activity. According to the results, it was found that the concentration of chia extract has a significant effect on free radical scavenging ($p < 0.05$) so that with increasing the concentration of the extract, its inhibitory properties increased. The results showed that the addition of different concentrations of chia seed extract and storage time were significant on the acidity and acid value

1, 2 and 3. Former MSc Student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

(*Corresponding Author Email: m.khani@qodsiau.ac.ir)

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2022.74270.1124](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.74270.1124)

of butter samples so that with increasing the amount of chia seed extract in treatments, the amounts of acidity and acid value increased significantly ($p<0.05$). Also, the acidity and acid value in all samples of butter increased significantly with increasing storage time during refrigeration ($p<0.05$). However, the amount of these two indices in treatments containing chia extract increased at a slower rate than the control sample during storage time, which could be due to the effect of phenolic compounds in chia seed extract in controlling the activity of lipolytic enzymes. Moreover, the results revealed that with increasing the concentration of the chia seed extract from the 15th day to the end of the storage period, the amounts of peroxide value and thiobarbituric acid of butter treatments significantly decreased compared to the control sample ($p<0.05$). This is due to the antioxidant effects of phenolic compounds in chia seed extract that delay the oxidation process. In this study, all chemical indices increased significantly during the storage time ($p<0.05$). All the samples in evaluated sensory properties were significantly different from the control sample (except odor) during 60 days of storage ($p<0.05$), in this way treatments had better sensory scores in color and taste properties compared to the control. In general, a concentration of 0.5% chia extract delayed oxidative damage, but in terms of sensory evaluation, a treatment containing 0.25% chia extract is selected and introduced as the most desirable treatment.

Keywords: Chia seed extract, Butter, Antioxidant activity, Chemical properties, Sensory properties.

مقاله علمی-پژوهشی

اثرات عصاره دانه چیا بر ویژگی‌های شیمیایی و حسی کره حاصل از خامه شیرین طی نگهداری در یخچال

زهرا صدری صائین^۱ - محمدرضا خانی^{۲*} - وجیهه فدائی نوغانی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۲

چکیده

کره به‌عنوان یک نوع فرآورده لبنی، از خامه شیرین یا خامه ترش تهیه می‌شود که می‌تواند به دلیل تغییرات اکسیداتیو دچار فساد شود. این تحقیق با هدف بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره دانه چیا در کره حاصل از خامه شیرین جهت بهبود ویژگی‌های شیمیایی (اسیدیته، عدد اسیدی، عدد پراکسید و اسید تیوباریتوریک) و حسی (رنگ، بو، طعم، بافت و پذیرش کلی) آن طی دو ماه نگهداری در یخچال انجام گردید. ابتدا عصاره الکلی دانه چیا تهیه و میزان پلی‌فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن ارزیابی گردید و سپس با درصدهای مختلف (۰/۵، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵) به کره افزوده شد و اثرات آن بر ویژگی‌های کره ارزیابی شد. نتایج مقدار پلی‌فنول کل حدود $111/79 \pm 1108/78$ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم عصاره و قدرت مهارکنندگی عصاره دانه چیا در محدوده غلظت ۲۰-۴ درصد، $0/47 \pm 35/17$ تا $2/95 \pm 64/92$ درصد به‌دست آمد. نتایج نشان داد با افزایش میزان عصاره دانه چیا در کره، میزان اسیدیته و عدد اسیدی به‌طور معنی داری نسبت به نمونه شاهد افزایش و عدد پراکسید و اسید تیوباریتوریک کاهش یافت ($p < 0/05$). همچنین تمامی این شاخص‌های شیمیایی با افزایش مدت زمان نگهداری به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند ($p < 0/05$). تمامی نمونه‌ها از نظر ویژگی‌های حسی (به استثنای بو) در طول ۶۰ روز نگهداری با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$)، به‌طوری‌که تیمارها از امتیازات رنگ و طعم بهتری نسبت به شاهد برخوردار بودند. به‌طور کلی غلظت ۰/۵ درصد عصاره چیا باعث به تعویق انداختن فساد اکسیداتیو گردید اما از نظر ارزیابی حسی، تیمار حاوی ۰/۲۵ درصد عصاره چیا به‌عنوان تیمار برتر انتخاب و معرفی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: عصاره دانه چیا، کره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ویژگی‌های شیمیایی، ویژگی‌های حسی.

مقدمه

نگهداری محصولات غذایی است (Abid et al., 2017). لیپولیز باعث تجمع اسیدهای چرب آزاد می‌شود که می‌تواند باعث ایجاد طعم‌های بد ترشیدگی، بوتیریکی، تلخی، صابونی یا گسی شود. در محصولات لبنی با محتوای بالای اسیدهای چرب اشباع نشده، اکسیداسیون باعث ایجاد طعم‌های فلزی، روغنی یا بی‌اتی می‌شود (Méndez-Cid et al., 2017). همچنین اکسیداسیون باعث ایجاد اکسیژن‌های واکنش‌پذیر می‌شود که با سرطان، التهاب، پیری و اختلالات قلبی-عروقی در ارتباط هستند (Raza et al., 2009). با افزودن مقادیر کم ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توان از اتواکسیداسیون جلوگیری کرد و یا آن را به تأخیر انداخت (Ozturk and Cakmakci, 2006). همچنین می‌توان با اضافه کردن آنتی‌اکسیدان ها، ماندگاری کره را افزایش داد (Raza et al., 2009). با این حال، ماهیت سرطان‌زای برخی از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و ترجیح مصرف‌کنندگان، سبب جلب توجه تولیدکنندگان به استفاده از آنتی-اکسیدان‌های طبیعی شده است (Lobo et al., 2010).

کره یکی از فرآورده‌های چرب شیر بوده که حاوی ۸۰ درصد چربی، ۱۶ درصد آب و ۴ درصد ماده خشک بدون چربی است و به طور گسترده در سراسر جهان مصرف می‌شود (Méndez-Cid et al., 2017). تولید صنعتی کره شامل استفاده از خامه به‌عنوان ماده اولیه و از طریق تبدیل امولسیون‌های روغن در آب به امولسیون‌های آب در روغن توسط کره‌زنی با سرعت بالا می‌باشد (Ewe and Loo, 2016).

فساد شیمیایی کره بر اثر هیدرولیز و اکسیداسیون چربی صورت می‌گیرد. در حقیقت، هنگامی که لیپولیز و اکسیداسیون اتفاق می‌افتد، منجر به رنسید شدن می‌شود که اغلب عامل اساسی تعیین‌کننده عمر

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: Email: m.khani@godsiau.ac.ir

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74270.1124

در سال‌های اخیر، به‌کارگیری از دانه چیا به شکل‌های مختلف در برخی محصولات غذایی مورد توجه و بررسی قرار گرفته است. در تحقیقی تولید پنیر نرم غنی شده با پودر دانه چیا را در طول مدت ۳۰ روز نگهداری مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که در پنیر غنی شده با پودر چیا، میزان کل مواد جامد، خاکستر و فیبر خام افزایش و چربی و pH کاهش یافت (Faid, 2017). در پژوهش دیگری با بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی ماست غنی شده با مقادیر مختلف دانه چیا گزارش شد که دانه چیا هیچ تأثیری بر pH و مقادیر اسیدیته قابل تیتراست نداشت و پلیست‌ها بافت، طعم، رنگ و ظاهر ماست شاهد و ماست با ۱/۵ درصد دانه چیا را نسبت به درصدهای بالاتر دانه چیا ترجیح دادند (Kibui et al., 2018). همچنین نتایج یک تحقیق مشخص نمود که با افزودن آرد دانه چیا به سوسیس مرغ، مقدار اسید تیوباریتوریک نسبت به نمونه شاهد در مدت ۲۱ روز نگهداری در دمای یخچال کاهش یافت (Limam and Mohamed, 2019). لذا با توجه به اثرات مفید بکارگیری از عصاره های گیاهی و اثرات قابل توجه استفاده از دانه چیا در برخی محصولات غذایی، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات عصاره دانه چیا به‌منظور بهبود ویژگی‌های شیمیایی و حسی کره حاصل از خامه شیرین در شرایط نگهداری در یخچال مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

دانه چیا از شرکت بسته‌بندی زیست فناوران سلامت محور ایرانیان (محصول کشور بولیوی) و خامه جهت تولید کره از شرکت لبنیات پاستوریزه پاک تهیه شد. همچنین کلیه مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده جهت انجام آزمون‌ها ساخت شرکت مرک آلمان بود.

تهیه عصاره الکلی دانه چیا

ابتدا دانه چیا آسیاب شد و پودر آن به مقدار ۵ درصد وزنی/حجمی به اتانول ۷۰ درصد افزوده شد و توسط شیکر (MS3 basic IKA، آلمان) با دور rpm ۲۰۰ به مدت ۶ ساعت هم زده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و سپس با کاغذ صافی واتمن صاف شد. عصاره فیلتر شده با استفاده از اواپراتور دوار تحت خلاء (laborta 4001، آلمان) برای تبخیر اتانول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. مخلوط تغلیظ شده در آون (ایران خودساز، OD 115p) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ظرف شیشه‌ای کهربایی در یخچال (RT791BATS، Samsung، کره) نگهداری شد (Kwon et al., 2019).

در پژوهشی اثر افزودن ترکیبات گیاهی طبیعی نظیر عصاره‌های کاسنی و رزماری را بر ویژگی‌های کره حاصل از خامه ترش مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که نمونه‌های حاوی این دو عصاره در مقایسه با نمونه شاهد، عدد اسیدی و پایداری اکسیداسیونی بیشتر و میزان ترکیبات پلی‌فنولی و عدد پراکسید کمتری داشتند اما میزان ترکیبات پلی‌فنولی در طول مدت نگهداری کاهش یافت (Ahmadi-aghdam et al., 2012). در تحقیق دیگری اثر عصاره دارچین را بر روی خواص کره بررسی و گزارش کردند که کره حاوی عصاره دارچین در مقایسه با نمونه شاهد، در طول مدت دو ماه نگهداری دارای عدد پراکسید و اسیدهای چرب آزاد کمتر بود و فعالیت آنتی-اکسیدانی دارچین توانست ماندگاری کره را افزایش دهد (Vidanagamage et al., 2016). همچنین نتایج یک تحقیق مشخص نمود که افزودن اسانس سیر به کره سبب کاهش و کند شدن روند اکسیداسیون گردید و با افزایش غلظت اسانس سیر، میزان عدد اسیدی کاهش و اسیدیته افزایش یافت (Aydın and Kahyaoglu, 2020). در مطالعه دیگری تأثیر عصاره هیدروالکلی پوسته مغز گردو روی ماندگاری کره سنتی در مدت زمان ۹۰ روز بررسی و گزارش کردند که نمونه شاهد در مقایسه با سایر تیمارها در مدت زمان نگهداری از عدد اسیدی، عدد پراکسید و اسیدهای چرب آزاد بیشتری برخوردار بود (Mehdizadeh et al., 2019). نتایج این تحقیقات و سایر موارد مشابه، دال بر اثرات مطلوب عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی بر ویژگی‌های مورد مطالعه در کره بوده که لزوم بررسی اثرات سایر ترکیبات طبیعی با منشأ گیاهی را دو چندان می‌کند.

چیا با نام علمی *Salvia hispanica L* گیاهی علفی یک ساله و متعلق به خانواده Lamiaceae می‌باشد و بومی جنوب مکزیک و شمال گواتمالا است (Inglett et al., 2014). دانه چیا دارای حدود ۹۰ تا ۹۳ درصد ماده خشک و حاوی ۲۵ تا ۴۰ درصد روغن است که حاوی اسیدهای چرب ضروری نظیر اسید آلفالینولنیک (امگا ۳) و اسید لینولنیک (امگا ۶) می‌باشد (Faid, 2017). بسیاری از ترکیبات زیست‌فعال با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالا در دانه‌های چیا مانند اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، توکوفرول‌ها و استرول‌ها وجود دارند (Kobus-Cisowska et al., 2019). مصرف دانه چیا به دلیل داشتن سطوح بالایی از پروتئین، مواد معدنی، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و فیبر غذایی دارای اثرات مفیدی بر سلامتی است (Guzmán-Díaz et al., 2019). دانه‌های چیا به دلیل تأثیرات مفید روی بیماری قلبی-عروقی، اختلالات سیستم‌های عصبی و گوارشی و تنظیم سطح کلسترول و تری‌گلیسیرید خون، به‌عنوان یک جزء غذایی فراسودمند مطرح هستند (Bustamante et al., 2017).

روش تولید نمونه‌های کره

تولید نمونه‌ها در کارخانه لبنیات پاستوریزه پاک انجام شد. بدین صورت که خامه با محتوای چربی استاندارد شده در دمای ۱۱۰-۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰-۱۰ ثانیه پاستوریزه گردید. سپس خامه به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید تا تبلور چربی شیر را تسهیل کند. برای تولید کره، ۴/۵ تا ۵ کیلوگرم خامه در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه تولید کره (EGLI، EKB2-1EP، سوئیس)، در ۱۵۰ دور در دقیقه تا زمانی که شکستگی مشاهده و ذرات کره تشکیل شود، چرن گردید. دوغ از ذرات کره جدا و کره ۳ بار با آب تصفیه شده با اسمز معکوس سرد (۱۰ درجه سانتی‌گراد) در چرن شستشو شد. سپس کره برای چند دقیقه در ۳۰ دور در دقیقه کار کرد تا محتوای آب آزاد کاهش یابد (O'Callaghan et al., 2016). سپس کره تولیدی به‌طور جداگانه با ۰/۵، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد از عصاره دانه چیا مخلوط شد تا نمونه‌های کاملاً همگن به‌دست آید. نمونه شاهد (C) و تیمارهای حاوی عصاره دانه چیا به ترتیب افزایش درصد عصاره (T₁، T₂، T₃ و T₄) در بسته‌های ۱۰۰ گرمی از جنس پلی‌پروپیلن پر شدند و در شرایط خلا بسته‌بندی و در یخچال به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند و در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ از نظر ویژگی‌های شیمیایی و حسی در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌فنل کل عصاره دانه چیا

به این منظور، در یک لوله آزمایش ۳۰ میکرولیتر عصاره، ۲۳۷۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۵۰ میکرولیتر از معرف فولین سیوکالتیو، به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس گردید. یک نمونه شاهد با جایگزینی عصاره با ۳۰ میکرولیتر اتانول تهیه گردید. بعد از ۲ دقیقه ۴۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۵ درصد اضافه شد و محلول‌ها به مدت ۱۰ ثانیه با ورتکس مخلوط شدند و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و به دور از نور نگهداری شدند و پس از آن میزان جذب در ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico، UV2100، اسپانیا) اندازه‌گیری شد. یک منحنی کالیبراسیون از اسید گالیک، در محدوده غلظت ۳۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، برای تعیین مقدار فنل کل استفاده گردید. نتایج به دست آمده بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم از نمونه بیان شد (Laczowski et al., 2018).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره دانه چیا

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با آزمون جذب رادیکال DPPH انجام شد. برای این منظور، مخلوط ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۴ تا ۲۰ درصد حجمی) و ۳۹۰۰

میکرولیتر محلول DPPH، در سه تکرار و یک نمونه شاهد با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول و ۳۹۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH تهیه شد. هر مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و پس از آن میزان جذب در اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی از اختلاف جذب نمونه شاهد و نمونه عصاره تقسیم بر جذب نمونه شاهد ضربدر ۱۰۰ به‌دست آمد. در نهایت با استفاده از میانگین جذب‌های خوانده شده، EC₅₀ (غلظت موثر ۵۰٪) برای عصاره الکلی دانه چیا محاسبه شد (Laczowski et al., 2018).

اندازه‌گیری اسیدیت و عدد اسیدی

میزان اسیدیت و عدد اسیدی در نمونه‌های کره با روش تیتراسیون با استفاده از مخلوط دو حلال (اتانول با خلوص حجمی ۹۶٪ و دی‌اتیل اتر) و معرف فنل فتالین و سپس تیتراسیون با محلول هیدروکسید پتاسیم با غلظت ۰/۱ مول بر لیتر به‌ترتیب مطابق با رابطه ۱ و ۲ محاسبه و بر حسب درصد و میلی‌گرم در گرم گزارش گردید (INSO 4178, 2009). در این رابطه‌ها، C غلظت حقیقی استاندارد حجمی هیدروکسید پتاسیم، V حجم استاندارد هیدروکسید پتاسیم بر حسب میلی‌لیتر، m وزن نمونه بر حسب گرم و M مولاریته بر حسب گرم بر مول اسید چرب غالب کره (اسید اولئیک) می‌باشد.

$$\text{FFA (\%)} = \text{VCM} \times 100 / m \times 100 \quad (1)$$

$$\text{AV (mg KOH/g)} = \text{VC} \times 56.1 / m \quad (2)$$

اندازه‌گیری عدد پراکسید

این شاخص در نمونه‌های کره با روش یدومتری با استفاده از محلول یدور پتاسیم و تیتراسیون با محلول استاندارد تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال مطابق با رابطه ۳ محاسبه و بر حسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن فعال در هر کیلوگرم گزارش گردید (INSO 4179, 2018). در این رابطه V حجم محلول تیوسولفات سدیم مورد استفاده برای اندازه‌گیری بر حسب میلی‌لیتر، V₀ حجم محلول استاندارد تیوسولفات سدیم مورد استفاده برای آزمون شاهد بر حسب میلی‌لیتر، N نرمالیت محلول تیوسولفات سدیم و m وزن نمونه بر حسب گرم می‌باشد.

$$\text{PV (meq O}_2\text{/kg)} = (\text{V} - \text{V}_0) \times \text{N} \times 100 / m \quad (3)$$

اندازه‌گیری اسید تیوباریتوریک

این شاخص در نمونه‌های کره با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از واکنشگر اسید تیوباریتوریک و بررسی جذب نوری محلول

در طول موج ۵۳۰ نانومتر مطابق با رابطه ۴ محاسبه و بر حسب میلی گرم مالون دی آلدئید بر کیلوگرم گزارش گردید (INSO 10494, 2007). در این رابطه A میزان جذب محلول آزمایش، B میزان جذب محلول شاهد و m وزن نمونه بر حسب گرم می باشد.

$$TBA \text{ (mg MDA/kg)} = (A-B) \times 50 / m \quad (۴)$$

ارزیابی حسی کره

با انتخاب ۱۵ ارزیاب آموزش ندیده، ویژگی های ارگانولپتیکی شامل طعم، بو، بافت، رنگ و پذیرش کلی تیمارها و نمونه شاهد در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ نگهداری با استفاده از آزمون هدونیک ۵ نقطه ای ارزیابی گردید. ارزیاب ها با اختصاص امتیاز ۱ تا ۵ نظر خود را اعلام کردند، به طوری که نمره های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب نشان دهنده کیفیت بسیار ضعیف، ضعیف، متوسط، خوب و خیلی خوب در نظر گرفته شد. نمونه ها یک ساعت قبل از انجام آنالیز از یخچال خارج شده تا به دمای ۱۳ درجه سانتی گراد برسند (Ahmadi-aghdam et al., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

برای بررسی تغییرات شیمیایی و حسی تیمارهای مختلف کره (۵ تیمار) در طول زمان (۵ مقطع) از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها و بررسی اثر معنی داری عصاره دانه چیا بر ویژگی های مورد مطالعه نمونه های کره با روش آنالیز واریانس دو طرفه و مقایسه بین میانگین های معنی دار با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) با استفاده از نرم افزار SPSS 14 انجام گرفت. تمامی آزمون ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

نتایج و بحث

مقدار پلی فنول کل و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره دانه چیا

عصاره دانه چیا منبع خوبی از ترکیبات فنولی مانند اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، میرستین، کوئرتستین و کامفرول است که در ایجاد فعالیت آنتی اکسیدانی موثراند (Laczkowski et al., 2018). در این تحقیق، میزان ترکیبات فنولی در محدوده $111/79 \pm 1108/78$ میلی گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم عصاره الکلی دانه چیا به دست آمد. همچنین قدرت مهارکنندگی عصاره الکلی دانه چیا در محدوده غلظت ۴ الی ۲۰ درصد حجمی، در محدوده $0/47 \pm 35/17$ تا $64/92 \pm 2/95$ درصد اندازه گیری شد. میزان غلظت موثر یا EC_{50} ، غلظت آنتی اکسیدان موجود در محیط است که توانایی از بین بردن ۵۰ درصد از رادیکال آزاد را دارد که در این

تحقیق در مورد عصاره دانه چیا به مقدار $0/592 \pm 12/13$ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه عصاره دانه چیا را می توان به مقادیر بالای ترکیبات فنولی موجود در دانه آن نسبت داد (Saber et al., 2021). بدیهی است هرچه EC_{50} کوچکتر باشد، قدرت آنتی اکسیدانی یا مهار رادیکال های آزاد بیشتر می باشد. با توجه به نتایج مشخص شد که غلظت عصاره چیا تاثیر معنی داری بر مهار رادیکال آزاد دارد، به طوری که با افزایش غلظت عصاره، خاصیت مهارکنندگی آن افزایش یافت ($p < 0/05$). نتایج تحقیق حاضر با نتایج Laczkowski و همکاران (۲۰۱۸) و Saber و همکاران (۲۰۲۱) که گزارش کردند عصاره دانه چیا دارای میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی است مطابقت دارد (Saber et al., 2021; Laczkowski et al., 2018).

میزان اسیدیت و عدد اسیدی نمونه های کره

نتایج اسیدیت و عدد اسیدی به ترتیب در جدول های ۱ و ۲ نشان داده شده است. اسیدیت به عنوان مقدار اسیدهای چرب آزاد و عدد اسیدی به عنوان مقدار میلی گرم پتاس مورد نیاز برای خنثی کردن اسیدهای چرب آزاد موجود در نمونه، دو تا از شاخص های شیمیایی مهم جهت کنترل کیفیت کره در زمان تولید و در طی ماندگاری هستند (Karim et al., 2009). بر اساس آنالیز واریانس، افزودن غلظت های مختلف عصاره دانه چیا و زمان نگهداری بر میزان اسیدیت و عدد اسیدی نمونه های کره معنی دار بود ($p < 0/05$). نتایج نشان داد که افزایش درصد استفاده از عصاره الکلی دانه چیا به طور معنی داری سبب افزایش اسیدیت و هم عدد اسیدی تیمارهای مختلف کره شد ($p < 0/05$). همچنین میزان اسیدیت و عدد اسیدی در تمامی نمونه های کره با افزایش زمان نگهداری در شرایط یخچالی به طور معنی داری افزایش یافت. با این حال، میزان این دو شاخص در تیمارهای حاوی عصاره چیا نسبت به نمونه شاهد با سرعت کمتری در طول مدت زمان نگهداری افزایش یافت که علت آن می تواند به اثر ترکیبات فنولی موجود در عصاره دانه چیا در کنترل فعالیت آنزیم های لیپولیتیک باشد. هر چند انتقال آنزیم های بسیار پایدار در برابر حرارت از شیر و خامه به شکل فعال به کره، باعث لیپولیز و هیدرولیز تری گلیسیریدها و فسفولیپیدهای غشای گویچه چربی در حضور آب و تولید اسیدهای چرب آزاد شده و میزان اسیدیت و عدد اسیدی در طی مدت نگهداری افزایش می یابد (Mortensen, 2016). البته در این تحقیق، میزان اسیدیت و عدد اسیدی در تمامی تیمارهای حاوی عصاره چیا از روز ۱۵ تا ۴۵ ام نگهداری ثابت بود ($p > 0/05$). چربی های حاوی آب زیاد نظیر کره بیشتر در معرض هیدرولیز و ایجاد طعم و بوی ناخوشایند هستند که عواملی نظیر میزان اسید، رطوبت، دما و

عصاره‌های مورد مطالعه در مقایسه با نمونه شاهد، اسیدیته و عدد اسیدی بیشتری را نشان دادند و در تمامی نمونه‌ها با افزایش مدت زمان نگهداری، میزان این دو شاخص افزایش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارند (Ahmadi-aghdam et al., 2012; Aydin and Kahyaoğlu, 2020; Mehdizadeh et al., 2019; (Faid, 2017).

آنزیم‌های هیدرولیز کننده مثل لیپاز می‌تواند سبب تشدید هیدرولیز چربی‌ها شوند (Ahmadi-aghdam et al., 2012). Aydin و Kahyaoğlu (۲۰۲۰) و Faid (۲۰۱۷) به ترتیب با بررسی اثر افزودن سیر به کره و پودر دانه چیا به پنیر، و Ahmadi-aghdam و همکاران (۲۰۱۲) و Mehdizadeh و همکاران (۲۰۱۹)، به ترتیب با بررسی اثر عصاره‌های رزماری و کاسنی و عصاره پوسته مغز گردو روی اسیدیته و عدد اسیدی نشان دادند که نمونه‌های حاوی سیر و پودر چیا و

جدول ۱- اسیدیته (درصد) نمونه‌های کره حاوی عصاره دانه چیا طی ۶۰ روز نگهداری در شرایط یخچالی (میانگین $\pm$ انحراف معیار)
Table 1- Acidity (%) of butter samples containing chia seed extract during 60 days refrigerated storage (Mean $\pm$ SD)

Treatment	Day				
	روز				
	1	15	30	45	60
C	0.62 $\pm$ 0.00 ^{De}	0.65 $\pm$ 0.00 ^{Ce}	0.66 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	0.66 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	0.67 $\pm$ 0.00 ^{Ad}
T ₁	0.65 $\pm$ 0.00 ^{Cd}	0.66 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	0.66 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	0.66 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	0.67 $\pm$ 0.00 ^{Ad}
T ₂	0.66 $\pm$ 0.00 ^{Cc}	0.67 $\pm$ 0.00 ^{Bc}	0.67 $\pm$ 0.00 ^{Bc}	0.67 $\pm$ 0.00 ^{Bc}	0.69 $\pm$ 0.00 ^{Ac}
T ₃	0.67 $\pm$ 0.00 ^{Cb}	0.69 $\pm$ 0.00 ^{Bb}	0.69 $\pm$ 0.00 ^{Bb}	0.69 $\pm$ 0.00 ^{Bb}	0.70 $\pm$ 0.00 ^{Ab}
T ₄	0.72 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	0.72 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	0.72 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	0.72 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	0.73 $\pm$ 0.00 ^{Aa}

^{a-e} Different lowercase in each column indicate a significant differences between treatments at the level of 5% ($p < 0.05$).

^{A-E} Different uppercase in each row indicate a significant differences between storage days at the level of 5% ($p < 0.05$).

(C: Control sample, T₁: Treatment of 0.05% chia extract, T₂: Treatment of 0.1% chia extract, T₃: Treatment of 0.25% chia extract, T₄: Treatment of 0.5% chia extract)

جدول ۲- عدد اسیدی (mg/g) نمونه‌های کره حاوی عصاره دانه چیا طی ۶۰ روز نگهداری در شرایط یخچالی (میانگین $\pm$ انحراف معیار)
Table 2- Acid value (mg/g) of butter samples containing chia seed extract during 60 days refrigerated storage (Mean $\pm$ SD)

Treatment	Day				
	روز				
	1	15	30	45	60
C	1.23 $\pm$ 0.00 ^{De}	1.29 $\pm$ 0.00 ^{Ce}	1.32 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	1.32 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	1.34 $\pm$ 0.00 ^{Ad}
T ₁	1.29 $\pm$ 0.00 ^{Cd}	1.32 $\pm$ 0.01 ^{Bd}	1.32 $\pm$ 0.01 ^{Bd}	1.32 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	1.34 $\pm$ 0.00 ^{Ad}
T ₂	1.32 $\pm$ 0.01 ^{Cc}	1.34 $\pm$ 0.00 ^{Bc}	1.34 $\pm$ 0.00 ^{Bc}	1.34 $\pm$ 0.00 ^{Bc}	1.37 $\pm$ 0.00 ^{Ac}
T ₃	1.34 $\pm$ 0.00 ^{Cb}	1.37 $\pm$ 0.00 ^{Bb}	1.37 $\pm$ 0.00 ^{Bb}	1.37 $\pm$ 0.00 ^{Bb}	1.43 $\pm$ 0.00 ^{Ab}
T ₄	1.43 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	1.43 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	1.43 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	1.43 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	1.46 $\pm$ 0.05 ^{Aa}

^{a-e} Different lowercase in each column indicate a significant differences between treatments at the level of 5% ($p < 0.05$).

^{A-E} Different uppercase in each row indicate a significant differences between storage days at the level of 5% ($p < 0.05$).

(C: Control sample, T₁: Treatment of 0.05% chia extract, T₂: Treatment of 0.1% chia extract, T₃: Treatment of 0.25% chia extract, T₄: Treatment of 0.5% chia extract)

عدد پراکسید و اسید تیوباربتوریک نمونه‌های کره

نتایج عدد پراکسید و اسید تیوباربتوریک نمونه‌های کره به ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. اکسیداسیون چربی‌ها و واکنش اکسیژن با پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع باعث تشکیل پراکسید و هیدروپراکسیدها می‌شود و با گذشت زمان و تجزیه و تخریب هیدروپراکسیدها می‌توان با اندازه گیری اسید تیوباربتوریک به میزان پیشرفت اکسیداسیون پی برد (Aydin and Kahyaoğlu, 2020). بر اساس آنالیز واریانس، اثرات غلظت عصاره دانه چیا، مدت زمان نگهداری و اثرات متقابل تیمار و زمان نگهداری بر میزان این دو

شاخص معنی‌دار بود ($p < 0.05$). همان طور که ملاحظه می‌شود با افزایش درصد به کارگیری عصاره الکلی دانه چیا از روز ۱۵ام تا انتهای مدت نگهداری، به طور معنی‌داری میزان عدد پراکسید و اسید تیوباربتوریک تیمارهای کره نسبت به نمونه شاهد و نیز نسبت به تیمارهای حاوی مقادیر کمتر عصاره چیا کاهش یافت ($p < 0.05$). علت این امر ناشی از اثرات آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیبات فنولی عصاره دانه چیا و به تاخیر انداختن روند اکسیداسیون می‌باشد (Kobus-Cisowska et al., 2019). با این حال، میزان هر دو شاخص عدد پراکسید و اسید تیوباربتوریک در تمامی نمونه‌ها با

افزایش مدت زمان نگهداری به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). دلیل این افزایش در طی مدت زمان نگهداری را می توان به فساد اکسیداتیو چربی و تشکیل محصولات اولیه (هیدروپراکسیدها) و ثانویه اکسیداسیون (مالون دی آلدئیدها) در طی نگهداری نسبت داد (Dehghan et al., 2018). هر چند که افزایش عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در نمونه شاهد با سرعت زیاد (به ترتیب از ۰/۲ به ۱/۷۶ meq O₂/kg و از ۰/۳۲ به ۱/۸۲ mg MDA/kg) و در تیمارهای حاوی عصاره الکلی دانه چیا به ویژه با مقادیر بیشتر عصاره با سرعت کمتری (در تیمار T4 به ترتیب از ۰/۲ به ۰/۴۲ meq O₂/kg و از ۰/۳۲ به ۰/۷۰ mg MDA/kg) اتفاق افتاد. دلیل این روند ناشی از افزایش قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی در نتیجه افزایش غلظت است که می توان آن را به افزایش تعداد جایگاه های فعال این ترکیبات برای واکنش با رادیکال های آزاد نسبت داد (Ghaderi-

افزایش مدت زمان نگهداری به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). دلیل این افزایش در طی مدت زمان نگهداری را می توان به فساد اکسیداتیو چربی و تشکیل محصولات اولیه (هیدروپراکسیدها) و ثانویه اکسیداسیون (مالون دی آلدئیدها) در طی نگهداری نسبت داد (Dehghan et al., 2018). هر چند که افزایش عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در نمونه شاهد با سرعت زیاد (به ترتیب از ۰/۲ به ۱/۷۶ meq O₂/kg و از ۰/۳۲ به ۱/۸۲ mg MDA/kg) و در تیمارهای حاوی عصاره الکلی دانه چیا به ویژه با مقادیر بیشتر عصاره با سرعت کمتری (در تیمار T4 به ترتیب از ۰/۲ به ۰/۴۲ meq O₂/kg و از ۰/۳۲ به ۰/۷۰ mg MDA/kg) اتفاق افتاد. دلیل این روند ناشی از افزایش قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی در نتیجه افزایش غلظت است که می توان آن را به افزایش تعداد جایگاه های فعال این ترکیبات برای واکنش با رادیکال های آزاد نسبت داد (Ghaderi-

جدول ۳- عدد پراکسید (meq O₂/kg) نمونه های کره حاوی عصاره دانه چیا طی ۶۰ روز نگهداری در شرایط یخچال (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

Table 3- Peroxide value (meq O₂/kg) of butter samples containing chia seed extract during 60 days refrigerated storage (Mean $\pm$ SD)

Treatment	Day				
	روز				
	1	15	30	45	60
C	0.20 $\pm$ 0.00 ^{Ea}	0.28 $\pm$ 0.01 ^{Db}	0.42 $\pm$ 0.01 ^{Ca}	0.94 $\pm$ 0.01 ^{Ba}	1.76 $\pm$ 0.01 ^{Aa}
T ₁	0.20 $\pm$ 0.00 ^{Ea}	0.32 $\pm$ 0.02 ^{Da}	0.38 $\pm$ 0.01 ^{Cb}	0.49 $\pm$ 0.00 ^{Bb}	1.28 $\pm$ 0.01 ^{Ab}
T ₂	0.20 $\pm$ 0.01 ^{Ea}	0.26 $\pm$ 0.00 ^{Dc}	0.34 $\pm$ 0.00 ^{Cc}	0.37 $\pm$ 0.01 ^{Bc}	0.86 $\pm$ 0.00 ^{Ad}
T ₃	0.20 $\pm$ 0.00 ^{Da}	0.27 $\pm$ 0.01 ^{Bc}	0.30 $\pm$ 0.00 ^{Cd}	0.36 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	0.92 $\pm$ 0.02 ^{Ac}
T ₄	0.20 $\pm$ 0.00 ^{Ca}	0.22 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	0.22 $\pm$ 0.00 ^{Be}	0.22 $\pm$ 0.00 ^{Be}	0.42 $\pm$ 0.00 ^{Ae}

^{a-e} Different lowercase in each column indicate a significant differences between treatments at the level of 5% ($p < 0.05$).

^{A-E} Different uppercase in each row indicate a significant differences between storage days at the level of 5% ($p < 0.05$).

(C: Control sample, T₁: Treatment of 0.05% chia extract, T₂: Treatment of 0.1% chia extract, T₃: Treatment of 0.25% chia extract, T₄: Treatment of 0.5% chia extract)

جدول ۴- میزان اسید تیوباربیتوریک (mg MDA/kg) نمونه های کره حاوی عصاره دانه چیا طی ۶۰ روز نگهداری در شرایط یخچالی (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

Table 4- Thiobarbituric acid value (mg MDA/kg) of butter samples containing chia seed extract during 60 days refrigerated storage (Mean $\pm$ SD)

Treatment	Day				
	روز				
	1	15	30	45	60
C	0.32 $\pm$ 0.00 ^{Ea}	0.49 $\pm$ 0.01 ^{Da}	0.85 $\pm$ 0.01 ^{Ca}	1.20 $\pm$ 0.00 ^{Ba}	1.82 $\pm$ 0.00 ^{Aa}
T ₁	0.32 $\pm$ 0.00 ^{Ea}	0.38 $\pm$ 0.01 ^{Db}	0.54 $\pm$ 0.01 ^{Cb}	0.67 $\pm$ 0.00 ^{Bb}	1.41 $\pm$ 0.00 ^{Ab}
T ₂	0.32 $\pm$ 0.01 ^{Ea}	0.38 $\pm$ 0.00 ^{Db}	0.46 $\pm$ 0.00 ^{Cc}	0.53 $\pm$ 0.00 ^{Bc}	1.10 $\pm$ 0.00 ^{Ac}
T ₃	0.32 $\pm$ 0.00 ^{Ea}	0.36 $\pm$ 0.01 ^{Dd}	0.40 $\pm$ 0.00 ^{Cd}	0.49 $\pm$ 0.00 ^{Bd}	0.90 $\pm$ 0.02 ^{Ad}
T ₄	0.32 $\pm$ 0.00 ^{Da}	0.37 $\pm$ 0.00 ^{Cc}	0.37 $\pm$ 0.00 ^{Ce}	0.43 $\pm$ 0.00 ^{Be}	0.70 $\pm$ 0.00 ^{Ae}

^{a-e} Different lowercase in each column indicate a significant differences between treatments at the level of 5% ($p < 0.05$).

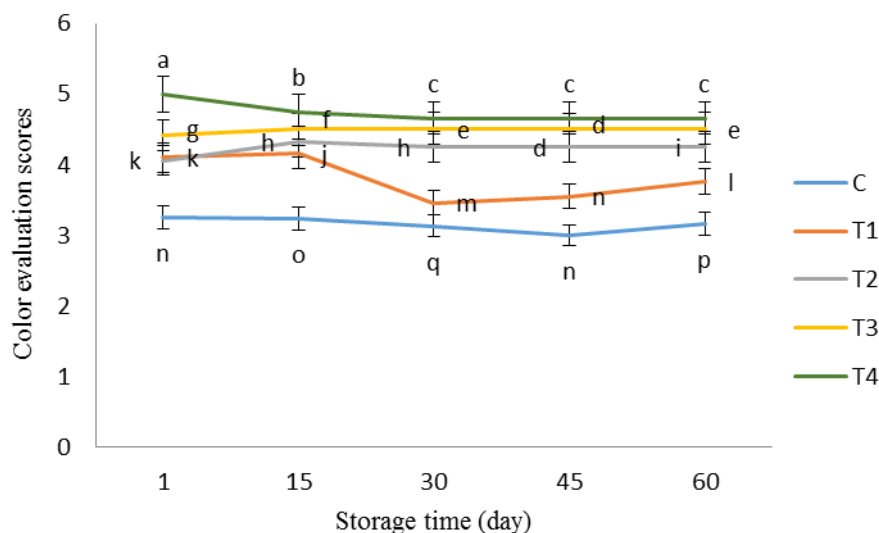
^{A-E} Different uppercase in each row indicate a significant differences between storage days at the level of 5% ($p < 0.05$).

(C: Control sample, T₁: Treatment of 0.05% chia extract, T₂: Treatment of 0.1% chia extract, T₃: Treatment of 0.25% chia extract, T₄: Treatment of 0.5% chia extract)

ویژگی‌های حسی نمونه‌های کره

نتایج آنالیز واریانس نشان داد درصد به‌کارگیری عصاره الکلی دانه چیا و همچنین مدت زمان نگهداری روی ارزیابی حسی بو اثر معنی داری نداشتند و تمامی نمونه‌ها از نظر ویژگی بو در طول مدت نگهداری از امتیازات مشابه و خوب بالای ۴ برخوردار بودند اما اثر نوع

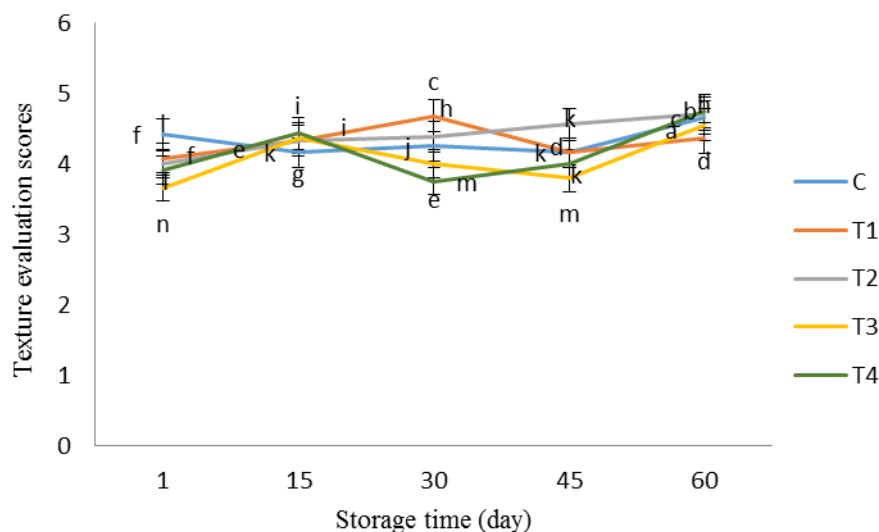
تیمار و زمان نگهداری روی سایر ویژگی‌های حسی شامل رنگ، بافت، طعم و پذیرش کلی نمونه‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.05$) که نتایج آنها به‌ترتیب در شکل‌های شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است.



شکل ۱- روند تغییرات امتیاز رنگ نمونه‌های کره حاوی عصاره دانه چیا در طی ۶۰ روز نگهداری در شرایط یخچالی

Fig. 1. Color scores of butter samples containing chia seed extract during 60 days refrigerated storage

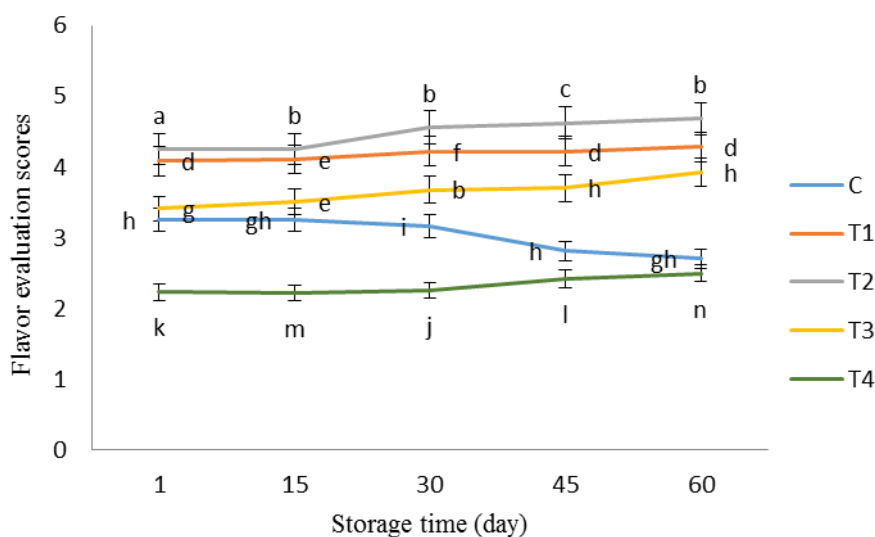
* Different lowercase in each day indicate a significant differences between treatments at the level of 5% ($p < 0.05$).
(C: Control, T₁: 0.05% chia extract, T₂: 0.1% chia extract, T₃: 0.25% chia extract, T₄: 0.5% chia extract)



شکل ۲- روند تغییرات امتیاز بافت نمونه‌های کره حاوی عصاره الکلی دانه چیا در طی ۶۰ روز نگهداری در شرایط یخچالی

Fig. 2. Texture scores of butter samples containing chia seed extract during 60 days refrigerated storage

* Different lowercase in each day indicate a significant differences between treatments at the level of 5% ($p < 0.05$).
(C: Control, T₁: 0.05% chia extract, T₂: 0.1% chia extract, T₃: 0.25% chia extract, T₄: 0.5% chia extract)

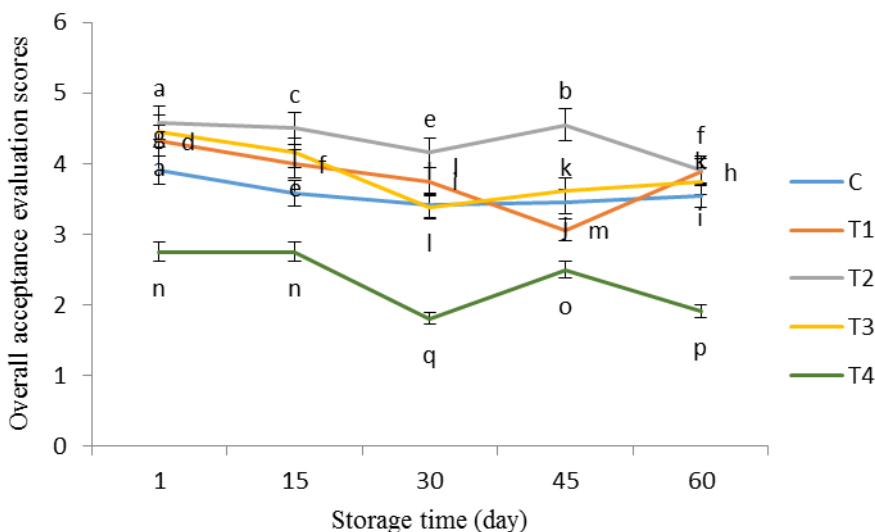


شکل ۳- روند تغییرات امتیاز طعم نمونه‌های کره حاوی عصاره الکلی دانه چیا در طی ۶۰ روز نگهداری در شرایط یخچالی

Fig. 3. Flavor scores of butter samples containing chia seed extract during 60 days refrigerated storage

* Different lowercase in each day indicate a significant differences between treatments at the level of 5% ($p < 0.05$).

(C: Control, T₁: 0.05% chia extract, T₂: 0.1% chia extract, T₃: 0.25% chia extract, T₄: 0.5% chia extract)



شکل ۴- روند تغییرات امتیاز پذیرش کلی نمونه‌های کره حاوی عصاره الکلی دانه چیا در طی ۶۰ روز نگهداری در شرایط یخچالی

Fig. 4. Overall acceptance scores of butter samples containing chia seed extract during 60 days refrigerated storage

* Different lowercase in each day indicate a significant differences between treatments at the level of 5% ($p < 0.05$).

(C: Control, T₁: 0.05% chia extract, T₂: 0.1% chia extract, T₃: 0.25% chia extract, T₄: 0.5% chia extract)

اسیدهای چرب غیراشباع باشد (Méndez-Cid et al., 2017). لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های شیمیایی در نمونه شاهد و تیمار T₁ که از میزان اکسیداسیون بیشتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند می‌توان کاهش امتیاز رنگ در آنها را نسبت به سایر تیمارها توجیه نمود. با این حال افزایش زمان نگهداری، امتیاز حسی

همانطور که ملاحظه می‌شود افزایش زمان نگهداری منجر به کاهش امتیاز حسی رنگ در نمونه شاهد و تیمار T₁ شده ولی افزایش درصد به‌کارگیری عصاره دانه چیا به‌طور معنی‌داری امتیاز رنگ را افزایش داد ($p < 0.05$). کاهش امتیاز رنگ در طول مدت نگهداری می‌تواند ناشی از اکسیداسیون محصولات لبنی با محتوای بالای

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، بر اساس نتایج پژوهش حاضر مشخص گردید که افزایش درصد به‌کارگیری عصاره الکلی دانه چیا در کره، سبب افزایش مقادیر اسیدیته و عدد اسیدی و کاهش عدد پراکسید و تیوباربیتوریک نسبت به نمونه شاهد شد اما افزایش مدت زمان نگهداری به‌طور معنی‌داری مقادیر اسیدیته، عدد اسیدی، عدد پراکسید و اسیدتیوباربیتوریک را افزایش داد، هر چند که در تیمارهای حاوی عصاره دانه چیا با روند کندتری اتفاق افتاد ($p < 0.05$). ارزیابی خصوصیات حسی نیز نشان داد که افزایش درصد به‌کارگیری عصاره الکلی دانه چیا در کره منجر به افزایش امتیاز ویژگی‌های حسی رنگ و نیز طعم (به جز تیمار T₄) در مقایسه با نمونه شاهد شد، هر چند که طعم و پذیرش کلی در بیشترین غلظت عصاره چیا در تیمار حاوی ۰/۵ درصد (T₄) نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. اما امتیاز حسی بو در تیمارهای مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). همچنین افزایش زمان نگهداری به‌طور معنی‌داری امتیاز خصوصیات حسی رنگ و پذیرش کلی را در تمامی نمونه‌های کره کاهش داد اما باعث افزایش امتیاز حسی طعم و بافت در تیمارها گردید ($p < 0.05$). در مجموع، تیمارهای حاوی درصدهای ۰/۱ و ۰/۲۵ عصاره دانه چیا (T₂ و T₃) از نظر همه ویژگی‌های حسی در طول مدت ۶۰ روز نگهداری از کیفیت قابل قبول و عمدتاً رضایت بخشی برخوردار بودند. لذا نتایج به‌دست آمده حاکی از آن است که کره حاوی عصاره الکلی دانه چیا به‌واسطه داشتن مقدار زیادی از ترکیبات فنولی، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا و نیز ویژگی‌های حسی مطلوبی است که می‌توان به‌کارگیری از آن را جهت به تعویق انداختن فساد اکسیداتیو و بهبود ویژگی‌های حسی کره توصیه نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از شرکت لبنیات پاستوریزه پاک و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس که شرایط و امکانات لازم را برای تولید نمونه‌ها و انجام آزمون‌ها فراهم آوردند اعلام می‌دارند.

بافت نمونه‌های کره را در روز ۶۰ام نسبت به روز اول به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($p < 0.05$). به‌طور کلی نتایج امتیازات بافت نمونه‌های کره از یک روند ثابت و مشخصی برخوردار نبود که دلیل آن می‌تواند ناشی از دمای نگهداری باشد که تأثیر زیادی در میزان سفتی کره دارد. همچنین افزودن سایر ترکیبات روغنی باعث کاهش سفتی می‌شود (Krause, 2006) و اکسیداسیون چربی نیز بر بافت محصولات لبنی تأثیر می‌گذارد.

از طرف دیگر، افزایش زمان نگهداری منجر به کاهش امتیاز حسی طعم در نمونه شاهد شد، اما امتیاز طعم تیمارهای حاوی عصاره چیا را افزایش داد. دلیل کاهش امتیاز حسی طعم در نمونه شاهد حین نگهداری، ناشی از تسریع اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است که باعث ایجاد طعم‌های نامطلوب می‌شود (Méndez-Cid et al., 2017). همچنین دما و مدت زمان نگهداری و نوع بسته‌بندی کره می‌تواند طعم کره را تحت تأثیر قرار دهند (Krause et al., 2008). در نهایت افزایش زمان نگهداری منجر به کاهش امتیاز حسی پذیرش کلی در تمامی نمونه‌ها شد و درصد به‌کارگیری عصاره الکلی دانه چیا به‌طور معنی‌داری امتیاز پذیرش کلی را در تیمار حاوی ۰/۵ درصد عصاره (T₄) کاهش و در سایر تیمارها نسبت به نمونه شاهد افزایش داد ($p < 0.05$). Fahimdanesh و Torabi-mofrad (۲۰۱۷)، Mehdi-zadeh و همکاران (۲۰۱۹)، Tafreshi و همکاران (۲۰۱۵)، به‌ترتیب با بررسی اثر افزودن کنجد و عصاره کنجاله کنجد، عصاره پوسته مغز گردو و عصاره رزماری بر کره و فیلم پلیمری کره گزارش کردند که با گذشت زمان امتیاز رنگ نمونه در کره‌ها کاهش یافت و افزایش غلظت عصاره و گذشت زمان سبب کاهش مقبولیت کلی نمونه‌ها شد ولی تأثیر قابل توجهی بر امتیاز بافت نداشت و با گذشت زمان امتیاز طعم نمونه‌ها روند کاهشی داشت و بهترین امتیاز پذیرش کلی به نمونه حاوی پایین‌ترین غلظت عصاره اختصاص یافت (Mehdizadeh et al., 2019 Torabi-mofrad and Kibui). همچنین (Fahimdanesh, 2017; Tafreshi et al., 2015) و همکاران (۲۰۱۸) گزارش دادند که پنلیست‌ها، بافت، طعم و رنگ ماست شاهد و ماست با ۱/۵ درصد دانه چیا را نسبت به مقادیر بیشتر دانه چیا ترجیح دادند که این نتایج در بسیاری از موارد با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارند (Kibui et al., 2018).

منابع

1. Abid, Y., Azabou, S., Jridi, M., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H. (2017). Storage stability of traditional Tunisian butter enriched with antioxidant extract from tomato processing by-products. *Journal of Food Chemistry*, 17: 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.125>
2. Ahmadi-aghdam, E., Hesari, J., Azadmard, S., Peighambaroust, H. (2012). Antioxidant effect of rosemary and cichorium extracts on the stability of butter from sour cream [dissertation]. Tabriz: Aras International Campus University, M.C. Faculty of Food Science and Technology [In Persian].

3. Aydın, S., Kahyaoglu, D.T., (2020). Antioxidant effect potential of garlic in vitro and real food system: effects of garlic supplementation on oxidation stability and sensory properties of butter. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(3): p.1900261.
4. Bustamante, M., Oomah, B.D., Rubilar, M., Shene, C. (2017). Effective lactobacillus plantarum and bifidobacterium infantis encapsulation with chia seed (*salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chemistry*, 216: 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.019>
5. Dehghan, B., Esmailzadeh Kenari, R., Raftani Amiri, Z. (2018). Investigate the antioxidant properties of orange peel essential oil (*Citrus sinensis*) on the stability of soybean oil during storage conditions. *Journal of Food Science and Nutrition*, 112 (11): 73-90 [In Persian].
6. Ewe, J.A., Loo, S.Y. (2016). Effect of cream fermentation on microbiological, physicochemical and rheological properties of *L. helveticus*-butter. *Journal of Food Chemistry*, 201: 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.049>
7. Faïd, S.M.A.E.F. (2017). Evaluation of yogurt and soft cheese fortified with chia seeds. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 12(1): 1-12.
8. Ghaderi-ghahfarokhi, M., Alami, M., Sadeghi Mahoonak, A., Azizi, M., Ghorbani, M. (2012). Effects of phenolic compounds extraction from acorn fruit's (*Quercus branti* var *persica* Lindl.) with different solvents on antioxidant activity in oxidative stability of sunflower oil. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 28 (1): 59-72 [In Persian].
9. Guzmán-Díaz, D.A., Treviño-Garza, M.Z., Rodríguez-Romero, B.A., Gallardo-Rivera, C.T., Amaya-Guerra, C.A., Báez-González, J.G. (2019). Development and characterization of gelled double emulsions based on Chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage mixed with different biopolymers and loaded with green tea extract (*Camellia sinensis*). *Foods*, 8(12): 677. <https://doi.org/10.3390/foods8120677>
10. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900261>
11. Inglett, G.E., Chen, D., Liu, S.X., Lee, S. (2014). Pasting and rheological properties of oat products dry-blended with ground chia seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1): 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.011>
12. INSO (Iran National Standards Organisation). (2007). Animal and vegetable fats and oils- Determination of 2-Thiobarbituric acid value direct- method. ISIRI no 10494. 1rd revision, Tehran [In Persian].
13. INSO. (2009). Animal and vegetable fats and oils- Determination of acid value and acidity- Test method. ISIRI no 4178. 1rd revision, Tehran [in Persian].
14. INSO. (2018). Animal and vegetable fats and oils- Determination of peroxide value- Iodometric (visual) endpoint determination. ISIRI no 4179. 2rd revision, Tehran [In Persian].
15. Karim, G., Mohammadi, K., Khandaghi, J., Karimi, H. (2009). Analysis of milk and milk products. 1st Ed., Tehran University Press, Tehran.
16. Kibui, A.N., Owaga, E., Mburu, M. (2018). Physicochemical properties, sensory evaluation and shelf life characteristics of chia enriched yoghurt. *Journal of Agriculture and Food Technology*, 8: 1-9.
17. Kobus-Cisowska, J., Szymanowska, D., Maciejewska, P., Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Cielecka-Piontek, J. (2019). In vitro screening for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition and antimicrobial activity of chia seeds (*Salvia hispanica*). *Electronic Journal of Biotechnology*, 37: 1-10.
18. Krause, A.J. (2006). Evaluation of consumer acceptance and storage stability of butter. MSc thesis, the Graduate Faculty of North Carolina State University.
19. Krause, A.J., Miracle, R.E., Sanders, T.H., Dean, L.L., Drake, M, A. (2008). The effect of refrigerated and frozen storage on butter flavor and texture. *Journal of Dairy Science*, 91(2): 455-465. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0717>
20. Kwon, H.C., Bae, H., Seo, H.G., Han, S.G. (2019). Chia seed extract enhances physiochemical and antioxidant properties of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 102(6): 4870-4876. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16129>
21. Laczkowski, M.S., Gonçalves, T.R., Gomes, S.T., Março, P.H., Valderrama, P., Matsushita, M. (2018). Application of chemometric methods in the evaluation of antioxidants activity from degreased chia seeds extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 95: 303-307. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.080>
22. Limam, S.A., Mohamed, R.A. (2019). Effect of incorporation of chia seeds flour in chicken sausage on TBA values and microbial quality during cooling storage. *Journal of Food Sciences*, 6(1): 97-103.
23. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8): 118-127.
24. Mehdizadeh, T., Mohammadipour, N., Langroodi, A.M., Raeisi, M. (2019). Effect of walnut kernel septum membranes hydroalcoholic extract on the shelf life of traditional butter. *Heliyon*, 5(3): e01296. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01296>

25. Méndez-Cid, F.J., Centeno, J.A., Martínez, S., Carballo, J. (2017). Changes in the chemical and physical characteristics of cow's milk butter during storage: Effects of temperature and addition of salt. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63: 121-32. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.032>
26. Mortensen, B.K. (2016). Butter and other milk fat products: The product and its manufacture. *Reference Module in Food Sciences*. 2nd Ed., Denmark: PP 1–7.
27. O'Callaghan, T.F., Faulkner, H., McAuliffe, S., O'Sullivan, M.G., Hennessy, D., Dillon, P., Ross, R.P. (2016). Quality characteristics, chemical composition, and sensory properties of butter from cows on pasture versus indoor feeding systems. *Journal of Dairy Science*, 99(12): 9441-9460.
28. Ozturk, S., Cakmakci, S. (2006). The effect of antioxidants on butter in relation to storage temperature and duration. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(11): 951-959. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600089>
29. Raza, S.A., Rashid, A., William, J., Najaf, S., Arshad, M. (2009). Effect of synthetic antioxidant on shelf life of locally manufactured butter known as Makhan in Pakistan. *Biharean Biologist*, 3(2): 161-162.
30. Saberi, F., Khorasani, S., Shahdadi, F. (2021). Effect of buckwheat, chia and quinoa on the physicochemical and antioxidant properties of ghavoot. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 112 (18): 237-245 [In Persian].
31. Tafreshi, F., Javanmard, M., Fahimdanesh, M. (2015). Effect of rosemary extract coated polymeric film (LDPE) for inhibition of butter oxidation. . *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11 (2): 128-139 [In Persian].
32. Torabi-mofrad, F., Fahimdanesh, M. (2017). Evaluation of physicochemical and microbial properties of butter enriched with sesame and sesame cake antioxidant extract during storage [dissertation]. Tehran: Islamic Azad University, M.C. Faculty of Food Science and Technology [In Persian].
33. Vidanagamage, S.A., Pathiraje, P.M.H.D., Perera, O.D.A.N. (2016). Effects of Cinnamon (*Cinnamomum verum*) extract on functional properties of butter. *Procedia Food Science*, 6: 136-142.



Effect of cyclodextrins and co-pigmentation on the thermal stability of the anthocyanin extract of Saffron petal in the model drink

Hamed Saberian^{*1} , Vahid Pasban²

Received: 2021.09.06

Revised: 2022.02.12

Accepted: 2022.04.11

Available Online: 2022.04.11

How to cite this article:

Saberian, H., Pasban, V. (2022). Effect of cyclodextrins and co-pigmentation on the thermal stability of the anthocyanin extract of Saffron petal in the model drink. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 756-777.

Abstract

Introduction: Anthocyanins are one of the most important of food colorants, which are found in many fruits, flowers, and vegetables, and have been used as natural pigments in commercial foods and beverage products due to their desirable colors and potential nutritional benefits. Saffron (*Crocus sativus*) is the most expensive spice of the world and an average 86.4% of wet weight or 96.4% of dry weight of saffron flowers is related to petals. Saffron petals usually do not have a commercial value but contain large amounts of anthocyanins, flavonoids and glycosides. Thus, these petals can be a good source of natural dyes applicable in pharmaceuticals, confectionery, and soft drinks. However, anthocyanins are readily unstable compounds with exposure to oxygen, pH, temperature, enzyme, light, as well as surrounding components, which reduces food color and quality. Losses of anthocyanins occur during juice processing and storage, and methods are needed to prevent these losses. Up to now, various methods including the encapsulation and the co-pigmentation have been tried to intensify the stability of anthocyanins. The co-pigmentation based on the molecular interactions, has been shown to be an efficient way to stabilize anthocyanins. The addition of organic acids, flavonoids, alkaloids, polysaccharides, proteins, etc. as a co-pigment, can improve the stability, and change the bioactivity of anthocyanins. Encapsulation of anthocyanins by alpha and beta cyclodextrins is a potential treatment that could d anthocyanin losses. Anthocyanins can form inclusion complexes with cyclodextrin molecules, which may protect anthocyanins from hydration and polymerization reactions. Therefore, saffron petal is a potential resource of anthocyanin in Iran. Low thermal stability of the anthocyanins caused a tendency to the synthetic colorants. Therefore, the main goal of this research was to investigate the effect of cyclodextrins and co-pigmentation on the anthocyanin extract of saffron petal during heat treatment.

Materials and Methods: Anthocyanin extract of saffron petal was extracted by 50% acidic ethanol solution at ambient temperature. Acidified extract was concentrated by a rotary evaporator at 40°C up to 9 percent concentration of solid materials. Different concentrations of alpha and beta cyclodextrin (10, 25, 50, 75 and 100 mole alpha or beta cyclodextrin to one mole anthocyanin) and also, different co-pigments such as gallic acid (at two molar ratio of 50:1 and 100:1 of galic acid/anthocyanin), ferulic acid (at two molar ratio of 50:1 and 100:1 of ferulic acid/anthocyanin), quercetin (at two molar ratio of 2.5:1 and 5:1 of quercetin/anthocyanin) and rutin (at two molar ratio of 10:1 and 25:1 of rutin/anthocyanin) were used to study the thermal stability of anthocyanin. Furthermore, the hydroalcoholic extract of rosehip was prepared and concentrated thereby, the rosehip extract (at two molar ratio of 50:1 and 100:1 gallic acid equivalent/anthocyanin) was used as a co-pigment. Total anthocyanin content was measured using differential pH method and reported based on mg of cyanidin 3-glucoside per 100 ml the model drink. a^* value was measured by Hunter Lab. Model drink (20 mM acid citric buffer in pH of 3) containing 0.01 % CaCl_2 and anthocyanin extract was prepared.

1. Assistant Professor of Food Additives Department, Food Science and Technology Research Institute, ACECR, Khorasan Razavi, Iran.

2. MSc. Student, Department of Food Science and Technology, ACECR Kashmar Higher Education Institute, Kashmar, Iran.

(*Corresponding Author Email: Saberian@acecr.ac.ir)

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.72368.1095

Prepared model drinks were heated at 90 °C during 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min and then, were cooled up to room temperature. Half time of anthocyanin was calculated and the mentioned treatments were investigated to evaluate the stability of the different compounds.

Results and Discussion: The results indicated that alpha cyclodextrin at molar ratio of 50:1 (alpha cyclodextrin to anthocyanin) hadn't any significant effect on the anthocyanin stability but beta cyclodextrin at molar ratio of 50:1 increased the colorant stability, which can be due to the smaller cavity of alpha cyclodextrin rather than beta cyclodextrin that lead to the lower interaction between alpha cyclodextrin and anthocyanin. Although, phenolic co-pigments hadn't any significant effect on the anthocyanin stability of the model drink but the rosehip extract at two molar ratios of 50:1 and 100: 1 increased the anthocyanin retention. Total phenolic content of rosehip extract was 14.56 g gallic acid equivalent per liter of the extract and total flavonoid content was 365 mg quercetin equivalent per liter of the extract. According to the studies and our results about total phenol and flavonoid content, the increased retention of the anthocyanin can be related to the variety of the phenolic and flavonoid compounds of the rosehip extract. Therefore, beta cyclodextrin as a trapping agent and rosehip extract as a co-pigment, can increase the anthocyanin stability of the saffron petal during heat treatment.

Keywords: Thermal stabilization, Anthocyanin, saffron petal, β -cyclodextrin, Rosehip extract.

مقاله علمی-پژوهشی

تأثیر سیکلودکسترین ها و کوپیگمانتاسیون بر پایداری حرارتی عصاره آنتوسیانینی گلبرگ زعفران در نوشیدنی مدل

حامد صابریان^{۱*} - وحید پاسبان نوقایی^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲

چکیده

آنتوسیانین ها یکی از مهمترین رنگدانه های غذایی هستند که کاربرد گسترده ای در محصولات غذایی دارند. یکی از منابع مستعد آنتوسیانین در ایران، گلبرگ زعفران می باشد. پایداری حرارتی نسبتاً پایین آنتوسیانین ها موجب استفاده بیشتر از رنگ های سنتزی شده است. هدف این پژوهش، بررسی تأثیر سیکلودکسترین ها و کوپیگمانتاسیون بر پایداری عصاره آنتوسیانینی استخراجی از گلبرگ زعفران در برابر تیمار حرارتی بود. از غلظت های مختلف آلفا و بتاسیکلودکسترین (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ مول آلفا/ بتاسیکلودکسترین به ازای ۱ مول آنتوسیانین) و همچنین از کوپیگمان های مختلفی از قبیل گالیک اسید (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ نسبت به آنتوسیانین)، فرولیک اسید (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ نسبت به آنتوسیانین)، کوئرستین (در دو نسبت مولی ۲/۵ به ۱ و ۵ به ۱ نسبت به آنتوسیانین) و روتین (در دو نسبت مولی ۱۰ به ۱ و ۲۵ به ۱ نسبت به آنتوسیانین) و عصاره نسترن کوهی (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ معادل گالیک اسید به آنتوسیانین) برای بررسی پایداری حرارتی آنتوسیانین ها استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که آلفاسیکلودکسترین تأثیر معنی داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) بر پایداری آنتوسیانین نداشت اما بتاسیکلودکسترین در نسبت مولی ۵۰ به ۱ (بتاسیکلودکسترین به آنتوسیانین) موجب افزایش پایداری رنگدانه شد. اگرچه ترکیبات فنولی تأثیری در پایداری حرارتی آنتوسیانین های نوشیدنی مدل نداشتند اما عصاره نسترن کوهی در هر دو نسبت مولی ۵۰ و ۱۰۰ به ۱ موجب افزایش معنی دار بقاء آنتوسیانین ها شد. بنابراین، بتاسیکلودکسترین به عنوان یک ترکیب پوشاننده و عصاره نسترن کوهی به عنوان یک ترکیب کوپیگمان می توانند موجب افزایش پایداری آنتوسیانین گلبرگ زعفران طی تیمار حرارتی شوند.

واژه های کلیدی: پایداری حرارتی، آنتوسیانین، گلبرگ زعفران، بتاسیکلودکسترین، عصاره نسترن کوهی.

مقدمه

آنتوسیانین ها به عنوان رنگدانه های غذایی در گستره وسیعی از محصولات از قبیل محصولات لبنی، نوشیدنی های با pH پایین، ژله ها و پاستیل ها و همچنین محصولات پختی (مانند کیک) کاربرد دارند (Chung et al., 2016).

زعفران (*Crocus sativus* L.) از جمله منابع گیاهی با ارزش بومی است که عمدتاً در مناطق گرم و خشک کشت می شود. بعد از جداسازی کلالة از گل زعفران، محصولات جانبی زعفران شامل کاسبرگ، گلبرگ، خامه و پرچم زعفران باقی می ماند. این مواد اگرچه حاوی مقادیر قابل ملاحظه ای ترکیبات با ارزش می باشند اما در حال حاضر به عنوان ضایعات بخش کشاورزی، بدون استفاده بوده و تنها به مصرف

رنگدانه های طبیعی، جایگزین بسیار مناسبی برای رنگ های سنتزی هستند و کاربرد آن ها در غذاها و نوشیدنی ها افزایش یافته است. افزایش کاربرد رنگدانه های سنتزی به دلیل رشد آگاهی های جامعه از اثرات جانبی ترکیبات شیمیایی و خطرات زیست محیطی آن ها می باشد (Carocho et al., 2014). آنتوسیانین ها، رنگدانه های غذایی طبیعی محلول در آب هستند که در طیف گسترده ای از میوه ها، سبزیجات و گل های مختلفی وجود دارند و مسئول ایجاد رنگ های قرمز، ارغوانی و آبی در آن ها می باشد (Ge et al., 2018).

* - نویسنده مسئول: Email: Saberian@acecr.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.72368.1095

۱- استادیار، گروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی کاشمر، کاشمر، ایران.

گروه‌های هیدروکسیل و متوکسیل، سطح گلیکوزیده شدن) و محیط حلال وابسته است (Asen et al., 1972). تجمع آسیدی حلقه پیران، حساسیت آنتوسیانین به حمله نوکلئوفیلی آب را کاهش می‌دهد و در نتیجه از تشکیل چالکون و بی‌رنگ شدن آنتوسیانین جلوگیری می‌کند. بنابراین، آنتوسیانین‌های آسیده شده مقاوم‌تر می‌باشند. پدیده کوپیگمانتاسیون غالباً موجب تغییر طول موج جذب به سمت طیف قرمز^۲ همراه با افزایش جذب و همچنین ایجاد رنگ پایدارتر طی زمان می‌شود (Mazza and Miniati, 1993).

تحقیقات مختلفی با هدف کاهش تخریب رنگ عصاره‌های آنتوسیانینی از گیاهان و میوه‌های مختلف با استفاده از گالیک اسید (Fan et al., 2019; Mollov et al., 2007; Zhao et al., 2020)، کوئرستین (Weber et al., 2017; Kanha et al., 2019)، روتین (Fan et al., 2019)، عصاره چای (Chung et al., 2016)، عصاره گل رز (Mollov et al., 2007) و عصاره پوست انار (Ertan et al., 2018) به‌عنوان کوپیگمان صورت گرفته است. با این حال، تاکنون گزارشی در مورد تاثیر این کوپیگمان‌ها و همچنین سیکلودکستری‌ها بر پایداری آنتوسیانین گلبرگ زعفران گزارش نشده است.

باتوجه به کاربرد گسترده رنگدانه‌های طبیعی جهت بهبود ظاهر غذا و نوشیدنی از یک طرف و وجود معایب آن‌ها از قبیل پایداری نسبتاً پایین در مقایسه با رنگ‌های سنتزی از طرف دیگر، پایداری آن‌ها ضرورت دارد. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر آلفا و بتاسیکلودکستری‌ها و همچنین مهمترین کوپیگمان‌ها جهت پایداری حرارتی آنتوسیانین استخراجی از گلبرگ زعفران بود. علاوه بر این، باتوجه به غنی بودن عصاره نسترن کوهی از ترکیبات فنولی (Saberian, 2018)، این عصاره نیز به‌عنوان یک ترکیب کوپیگمان مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

گلبرگ خشک زعفران از مزارع زعفران مشهد تهیه شد. اتانول با درجه آزمایشگاهی از شرکت دکتر مجلی (صنایع شیمیایی دکتر مجلی، ایران) خریداری شد. سیتریک اسید، فرولیک اسید، گالیک اسید، روتین، کوئرستین، سدیم سترات، آلفا و بتاسیکلودکستری‌ها از شرکت تیتراکم خریداری شد. میوه نسترن کوهی از لرستان تهیه شد.

خوراک دام می‌رسند یا در محیط زیست رها می‌شوند (Einafshar, 2018). منابع عمده آنتوسیانین‌ها در جهان، پوست و تفاله انگور قرمز و هویج سیاه (یا ارغوانی) می‌باشد. با توجه به اینکه این منابع عمدتاً بومی کشور ما نمی‌باشند، قاعدتاً در اولویت قرار نمی‌گیرند. از طرفی، باتوجه به تولید سالیانه حدود ۳۰۰ هزار تن گلبرگ زعفران در کشور و هدر رفت آن در مزارع، این منبع از پتانسیل بسیار مناسبی، به‌عنوان منبع ارزان قیمت، وافر و در دسترس، برای تولید آنتوسیانین برخوردار می‌باشد.

اگرچه آنتوسیانین‌ها کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی و دارویی دارند اما معایب آن‌ها از قبیل پایداری نسبتاً پایین در مقایسه با رنگ‌های سنتزی، ایجاد چالش کرده است (Cortez et al., 2014). عوامل فیزیکوشیمیایی مختلفی از قبیل pH محصول، قرار گرفتن در معرض نور، دما و ایجاد کمپلکس با ترکیبات دیگر موجود در محصول، پایداری آنتوسیانین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Sui et al., 2014). روش‌های مختلفی جهت کاهش تخریب آنتوسیانین‌ها به‌عنوان مسأله اصلی این پژوهش ارائه شده است که مهمترین آن‌ها شامل ریزپوشانی و کوپیگمانتاسیون^۱ آنتوسیانین‌ها می‌باشد (Li et al., 2014; Khazaei et al., 2016; Chung et al., 2015; Fernandes et al., 2013; Howard et al., 2013).

ریزپوشانی آنتوسیانین‌ها با سیکلودکستری‌ها فرآیند مطلوبی جهت کاهش تخریب آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این، ریزپوشانی می‌تواند موجب بهبود زیست‌فراهمی آنتوسیانین‌ها در دستگاه گوارش گردد. آنتوسیانین‌ها قادر هستند با بتاسیکلودکستری پیوند و تشکیل کمپلکس دهند تا از واکنش‌های هیدراتاسیون و پلی‌مریزاسیون در امان بمانند (Howard et al., 2013). با به دام انداختن آنتوسیانین‌ها در ماتریس پلی‌مری، آن‌ها کمتر در معرض اکسید شدن قرار می‌گیرند و بنابراین پایداری و زمان انبارمانی بیشتری خواهند داشت (Weber et al., 2017).

واکنش آنتوسیانین‌ها با سایر ترکیبات از قبیل ترکیبات فنولی، به‌عنوان یک روش پایداری مورد توجه قرار گرفته است. این واکنش‌ها شامل واکنش بین آنتوسیانین‌ها (Self-association)، کوپیگمانتاسیون داخل مولکولی با گروه‌های آروماتیک و کوپیگمانتاسیون بین مولکولی با مواد غیررنگی مانند فلاونول یا فلاون‌ها می‌باشد (Cavalcanti et al., 2011). کوپیگمانتاسیون بر پایه واکنش مولکولی به‌عنوان روش موثری در این زمینه شناخته شده است به‌گونه‌ای که با افزودن اسیدهای آلی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و غیره می‌توان پایداری آنتوسیانین‌ها را بهبود بخشید. مکانیسم عمل عمدتاً به ساختار شیمیایی آنتوسیانین‌ها (تعداد

استخراج عصاره آنتوسیانینی

(در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ نسبت به آنتوسیانین)، کوئرتستین (در دو نسبت مولی ۲/۵ به ۱ و ۵ به ۱ نسبت به آنتوسیانین) و روتین (در دو نسبت مولی ۱۰ به ۱ و ۲۵ به ۱ نسبت به آنتوسیانین) بود (Weber et al., 2017; Fan et al., 2019; Shikov et al., 2008). علت اینکه از غلظت‌های کمتری از کوئرتستین و روتین استفاده شد، عدم حلالیت مقادیر بیشتر آن‌ها در نوشیدنی بود که خود این عامل منجر به ایجاد رنگ نامطلوبی نیز در نوشیدنی می‌شد.

عصاره‌گیری نستر کوهی و کوپیگمانتاسیون عصاره آنتوسیانینی با استفاده از آن

عصاره‌گیری از میوه نستر کوهی مطابق روش Saberian (۲۰۲۰) انجام شد. بر این اساس، استخراج دو مرحله‌ای انجام شد تا هم بیشترین میزان کاروتنوئید کل و فلاونوئید کل استخراج شود (در شرایط بهینه شامل نسبت حلال به ماده جامد ۱۴/۹۴ میلی‌لیتر بر گرم، زمان ۶ ساعت و غلظت اتانول ۹۶٪) و هم بیشترین ترکیبات فنولی کل (در شرایط بهینه نسبت حلال به ماده جامد ۱۵ میلی‌لیتر بر گرم، زمان ۶ ساعت و غلظت اتانول ۳۵/۸٪ (حجمی/حجمی)). در نهایت، عصاره‌های حاصله ترکیب شد و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط خلأ تغلیظ شد و به روش خشک کردن انجمادی خشک شد (Saberian, 2020).

عصاره نستر کوهی در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ (معادل گالیک اسید به آنتوسیانین) نسبت به آنتوسیانین استفاده شد. قابل ذکر است که میوه نستر کوهی حاوی مقادیر بسیار زیادی از ترکیبات فنولی (حدود ۱۰٪ وزن ماده خشک) می‌باشد (Saberian, 2018). تاثیر کوپیگمان‌های مختلف بر پایداری حرارتی آنتوسیانین موجود در نوشیدنی مدل بررسی شد (Fan et al., 2019).

اندازه‌گیری غلظت آنتوسیانین

غلظت آنتوسیانین نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis معادله ۱ برآورد و نتایج مقایسه شد (Jafari et al., 2016).

$$(1) \quad (mg/L) = (A \times Mw \times DF) / (\epsilon \times L)$$

که در آن، $A = (A_{530} - A_{700})$ pH 1.0- $(A_{530} - A_{700})$ pH 4.5 = DF = وزن مولکولی آنتوسیانین (۴۴۹/۲ g/mol) است، ϵ = ضریب (۲۶/۹۰۰ L/cmmol)، L = طول مسیر (۱ سانتی‌متر) است.

با توجه به اینکه آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران عمدتاً از نوع سیانیدین گلیکوزید می‌باشند، نتایج بر مبنای سیانیدین ۳-گلیکوزید بیان شدند.

به‌منظور استخراج آنتوسیانین موجود در گلبرگ زعفران، از روش بهینه شده توسط Bolourian (۲۰۲۰) استفاده شد. ابتدا گلبرگ زعفران خشک شده در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد توسط آسیاب آزمایشگاهی خرد شده و پودر با مش ۱۶ تهیه شد و پس از توزین، با حلال (اتانول ۵۰٪ اسیدی شده با pH برابر با ۲) به نسبت ۱:۲۵ (حجمی/وزنی) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۲ دقیقه به‌منظور استخراج قرار گرفت (Bolourian, 2020). در مرحله بعد، عصاره استخراج شده با استفاده از سانتریفوژ و کاغذ صافی واتمن صاف گردید. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه اواپراتور تحت خلأ در دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به بریکس حدود ۹ تغلیظ شد و تا زمان کاربرد، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس این عصاره در روش‌های مختلف پایداری‌سازی به کار برده شد (Khazaei et al., 2014).

تولید نوشیدنی مدل

نوشیدنی مدل حاوی ۸٪ (وزنی/وزنی) عصاره آنتوسیانینی و ۰/۰۱٪ کلرید کلسیم در بافر اسید سیتریک ۲۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۳ تهیه شد (Chung et al., 2015).

بهینه‌سازی استفاده از غلظت‌های مختلف سیکلودکسترین (آلفا و بتا)

نسبت‌های مختلف مولی آلفا و بتا سیکلودکسترین به آنتوسیانین (براساس سیانیدین گلوکوزاید) جهت بررسی تاثیر پایداری آن‌ها بر آنتوسیانین‌ها بررسی شد. این نسبت‌ها شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ مول آلفا/بتا سیکلودکسترین به ازای ۱ مول آنتوسیانین بود (Howard et al., 2013). ابتدا نوشیدنی مدل در pH برابر ۳ تهیه شد. pH پایین این اطمینان را ایجاد می‌کند که آنتوسیانین به صورت یون فلاویلیوم باشد و از تخریب محافظت شود. سپس نسبت‌های سیکلودکسترین فوق به نوشیدنی مدل افزوده شد و محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰ دور بر دقیقه همزده شد. سپس به مدت ۲ ساعت به حال خود رها شد تا به تعادل برسد و آماده تیمار حرارتی شد (Fernandes et al., 2013).

کوپیگمانتاسیون عصاره آنتوسیانینی با استفاده از ترکیبات مختلف

در این مرحله، کوپیگمان‌های مهمی که در پژوهش‌های سایر محققین به عنوان کوپیگمان در پایداری‌سازی آنتوسیانین‌ها موثر شناخته شده بودند، به کار گرفته شد. این کوپیگمان‌ها شامل گالیک اسید (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ نسبت به آنتوسیانین)، فرولیک اسید

استخراج و اندازه‌گیری میزان فنول کل

میزان فنول کل نمونه‌ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو مطابق روش [Ercisli](#) و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد ([Ercisli, 2007](#)). برای این منظور، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره نمونه‌های استخراج شده در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه برای مدت یک ساعت حل شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از نمونه صاف شده به فالکون منتقل شد. ۲/۸ میلی لیتر آب دیونیزه به فالکون افزوده شد. پس از افزودن ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۲٪ به فالکون و گذشت زمان ۳ دقیقه، میزان ۰/۱ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتو ۵۰٪ نیز به آن افزوده شد و سپس به طور کامل همزدن صورت گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Biochrom, BC47358، انگلستان) خوانده شد. گالیک اسید به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و غلظت‌های ۱۰۰۰- میلی گرم بر لیتر (ppm) برای رسم منحنی استاندارد تهیه شد. نتایج به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه بیان شد.

تعیین میزان فلاونوئید کل

محتوی فلاونوئید کل مطابق روش [Chang](#) و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد ([Chang et al., 2002](#)). ۰/۵ میلی لیتر از عصاره استخراجی با ۱/۵ میلی لیتر از اتانول ۹۵٪ مخلوط شد و سپس ۰/۱ میلی لیتر محلول اتانولی کلرید آلومینیوم ۱۰٪ وزنی/حجمی و ۰/۱ میلی لیتر از استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از همزدن کامل محلول، به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و جذب نمونه در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل نمونه شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom, BC47358، انگلستان) خوانده شد. منحنی استاندارد کوئرستین (سیگما آلدریج) در غلظت ۲۵-۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (ppm) رسم شد. میزان فلاونوئید کل بر اساس میزان معادل "میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره" گزارش شد.

اندازه‌گیری شاخص رنگی

برای ارزیابی رنگ‌های خوراکی عمدتاً از سیستم CIELab استفاده شد که طی آن سه شاخص روشنایی/تاریکی (L^*)، قرمزی/سبزی (a^*) و زردی/آبی (b^*) اندازه‌گیری شدند. این شاخص‌ها با استفاده از دستگاه هانتربل (HunterLab Colorflex، C04-1005، 631، تایوان) صورت پذیرفت ([Saberian et al., 2013](#)). تغییرات کلی رنگ (ΔE) نمونه‌ها با استفاده از معادله ۲ بر حسب پارامترهای رنگی L^* ، a^* و b^* محاسبه شد:

$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L_t^*)^2 + (a_0^* - a_t^*)^2 + (b_0^* - b_t^*)^2} \quad (2)$$

در این فرمول L_0^* ، a_0^* و b_0^* مقادیر اولیه پارامترهای رنگی و L_t^* ، a_t^* و b_t^* مقادیر پارامترهای رنگی نمونه‌ها پس از تیمار حرارتی می‌باشند ([Jafari et al., 2016](#)).

آزمون پایداری حرارتی و بررسی کینتیک تخریب آنتوسیانین

نوشیدنی مدل (بافر اسید سیتریک ۲۰ میلی مولار در pH برابر با ۳) حاوی ۰/۱٪ کلرید کلسیم و عصاره آنتوسیانینی تهیه شد. نوشیدنی‌های مدل تهیه شده در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه حرارت داده شدند و سپس تا دمای محیط سرد شدند. زمان نیمه عمر آنتوسیانین محاسبه شد و تیمارهای ذکر شده برای بررسی تاثیر پایدارسازی، در آن زمان مورد بررسی قرار گرفتند ([Chung et al., 2015](#); [Chung et al., 2016](#)). زمان نیمه عمر ($T_{1/2}$) براساس غلظت آنتوسیانین از معادله زیر محاسبه شد:

$$\frac{C}{C_0} = \exp(-Kt) \quad (3)$$

که در این فرمول C غلظت رنگدانه‌ها در زمان t (حرارت‌دهی در دماهای مختلف)، C_0 نشانگر غلظت رنگدانه‌های اولیه می‌باشد. K (روز^{-۱}) ثابت سرعت واکنش است ([Fan et al., 2019](#)).

$$T_{1/2} = \frac{-\ln 0.5}{K} \quad (4)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

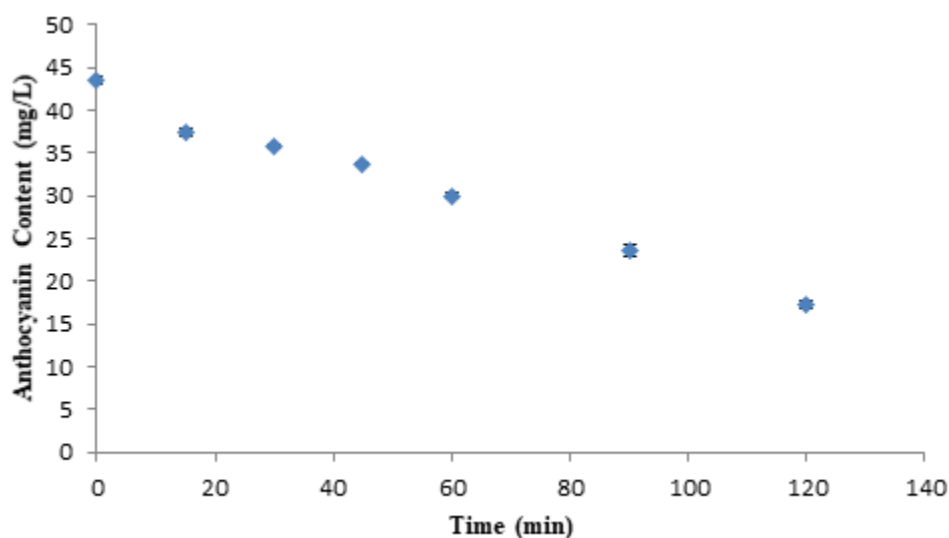
برای بررسی تاثیر آلفا/بتاسیکلودکسترین بر پایداری آنتوسیانین‌ها از طرح فاکتوریل استفاده شد. برای مقایسه تاثیر کوپیگمان‌های مختلف بر پایدارسازی آنتوسیانین در نوشیدنی مدل نیز از طرح یک فاکتور در یک زمان استفاده شد. آزمایش‌ها به‌طور عمده در حداقل دو تکرار انجام شدند و سپس میانگین و انحراف معیار داده‌ها به‌دست آمد. جهت مطالعه وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف، از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون توکی استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab 17 صورت پذیرفت. همچنین، زمان نیمه عمر تخریب آنتوسیانین‌ها با استفاده از نرم‌افزار Matlab 16 تعیین شد.

نتایج و بحث

پایداری حرارتی نوشیدنی مدل حاوی عصاره آنتوسیانینی

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش زمان حرارت‌دهی، میزان آنتوسیانین به شدت کاهش یافت ($p < 0.05$).

شاخص قرمزی به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافت (داده‌ها ذکر نشده‌اند) که همبستگی خوبی با میزان آنتوسیانین دارد و نشان‌دهنده تخریب آنتوسیانین می‌باشد.



شکل ۱- پایداری حرارتی آنتوسیانین در نوشیدنی مدل
Fig. 1. Heat stability in the model drink

شاخص قرمزی نوشیدنی‌های مدل حاوی نسبت‌های مولی مختلف آلفا و بتاسیکلودکسترین قبل و بعد از تیمار حرارتی مورد بررسی قرار گرفت. علت بررسی شاخص قرمزی نوشیدنی‌ها قبل از تیمار حرارتی آن بود که در نسبت‌های مولی بالای بتاسیکلودکسترین، رنگ نوشیدنی کمی تغییر می‌کرد و با بررسی متغیرها در قالب طرح فاکتوریل، تغییر شاخص قرمزی اشتباه‌ها به تیمار حرارتی نسبت داده نمی‌شود.

نتایج حاکی از آن بود که تیمار حرارتی، نوع سیکلودکسترین و غلظت آن تاثیر معنی‌داری بر شاخص قرمزی داشتند (جدول ۱). همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، شاخص قرمزی نمونه‌های حاوی بتاسیکلودکسترین به‌طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های حاوی آلفاسیکلودکسترین بود. همچنین تیمار حرارتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای شاخص قرمزی را تحت تاثیر قرار داد و موجب کاهش آن شد که می‌تواند به تخریب آنتوسیانین‌ها طی تیمار حرارتی نسبت داده شود.

توانایی مولکول‌های حلقوی برای تشکیل کمپلکس با یک مولکول مهمان وابسته به دو عامل ممانعت فضایی و برهمکنش‌های ترمودینامیکی بین ترکیبات مختلف سیستم (سیکلودکسترین، مولکول مهمان و حلال) می‌باشد. چندین نیرو از قبیل نیروهای واندروالسی (برهمکنش‌های هیدروفوبی و دی-پل-دی-پل) و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی در واکنش بین حفره سیکلودکسترین و مولکول مهمان نقش

براساس شکل ۱ و همچنین با استفاده از مدل درجه یک در نرم‌افزار Matlab مشخص شد که زمان نیمه عمر تخریب آنتوسیانین ۱۰۰/۸ دقیقه است.

شاخص قرمزی نوشیدنی مدل نیز در زمان‌های مختلف حرارت‌دهی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد و با افزایش زمان حرارت‌دهی،

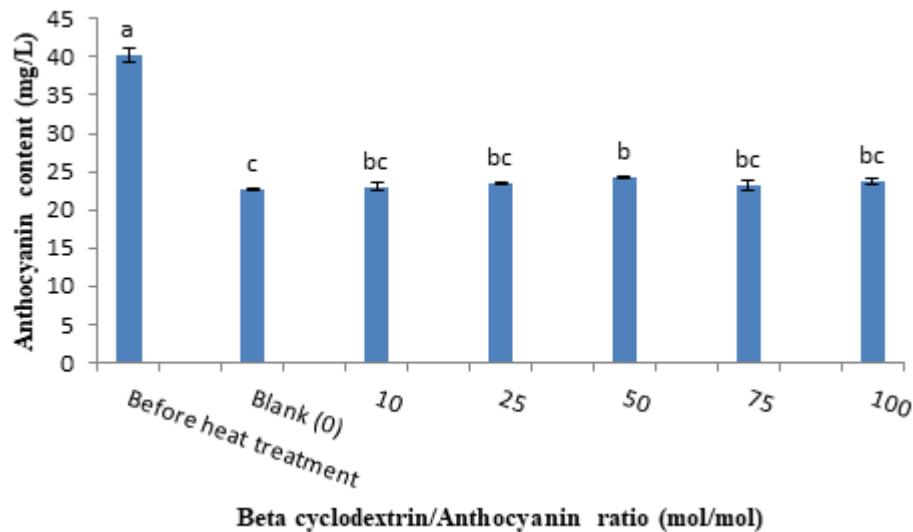
پایدارسازی آنتوسیانین‌ها با استفاده از آلفا/بتاسیکلودکسترین

ریزپوشانی آنتوسیانین‌ها با سیکلودکسترین‌ها فرآیند مطلوبی جهت کاهش تخریب آن‌ها در برابر شرایط محیطی (از قبیل نور و دما و pH و غیره) می‌باشد. آنتوسیانین‌ها قادر هستند با بتاسیکلودکسترین پیوند و تشکیل کمپلکس دهند تا از واکنش‌های هیدراتاسیون و پلی‌مریزاسیون در امان بمانند (Howard et al., 2013). جهت بررسی تاثیر پایدارسازی آلفا و بتاسیکلودکسترین بر آنتوسیانین‌ها، نسبت‌های مختلف مولی سیکلودکسترین به آنتوسیانین (بر اساس سیانیدین گلوکوزاید) بررسی شد. این نسبت‌ها شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ مول آلفا/بتاسیکلودکسترین به ازای ۱ مول آنتوسیانین بود.

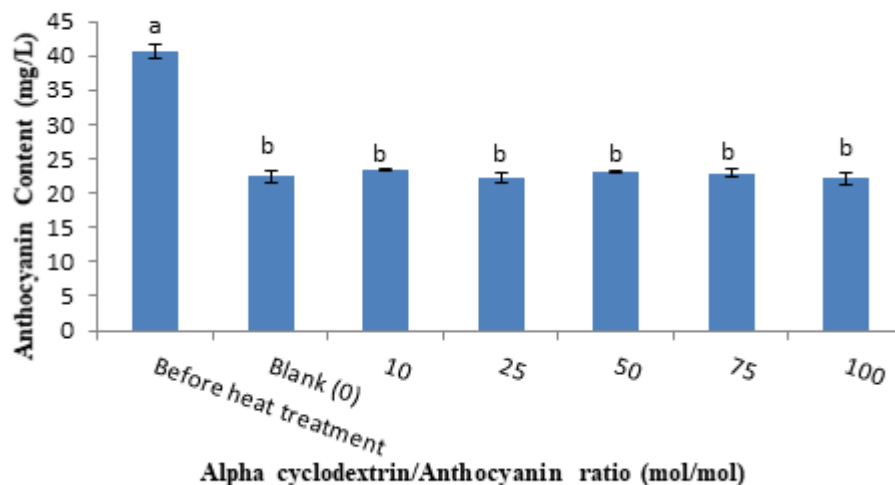
همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، افزودن بتاسیکلودکسترین در نسبت مولی ۵۰ به ۱، موجب افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) در غلظت آنتوسیانین باقی مانده در نوشیدنی مدل (نسبت به نمونه کنترل) پس از تیمار حرارتی (در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰۰/۸ دقیقه) شد و سایر نسبت‌های مولی تفاوت معنی‌داری با نمونه کنترل نداشتند. با این حال، افزودن آلفاسیکلودکسترین هیچگونه تاثیر معنی‌داری بر پایداری آنتوسیانین در نوشیدنی مدل نداشت (شکل ۳).

که به خاطر کوچک تر بودن حفره آلفاسیکلودکسترین نسبت به نوع بتا، احتمالاً برهمکنش های زیادی بین حفره آلفاسیکلودکسترین و آنتوسیانین برقرار نشده است و بنابراین پیوندهای ضعیف تری برقرار شده است (Fernandes et al., 2013). Howard و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده کردند که افزودن ۳٪ بتاسیکلودکسترین به عصاره Chokeberry در pH های مختلف ۲/۸ تا ۳/۶ موجب افزایش غلظت آنتوسیانین محلول آزمون به میزان ۴۹٪ نسبت به نمونه کنترل شد.

دارند که قادر به تشکیل کمپلکس پایدار هستند (Bourvellec, 2003). Fernandes و همکاران (۲۰۱۳) که تاثیر نسبت های مولی مختلف آلفا و بتاسیکلودکسترین (۴-۵۰ مول) به (یک مول) سیانیدین ۳-گلیکوزید را بررسی می کردند مشاهده کردند که افزودن بتاسیکلودکسترین منجر به کاهش رنگ محلول آنتوسیانینی شد و این کاهش رنگ در pH های بالاتر بیشتر بود. با این حال، با افزودن آلفاسیکلودکسترین، هیچگونه تغییری در رنگ محلول آنتوسیانینی مشاهده نکردند. آن ها نتیجه گرفتند



شکل ۲- تاثیر نسبت مولی بتاسیکلودکسترین به آنتوسیانین بر پایداری آنتوسیانین پس از ۱۰۰ دقیقه تیمار حرارتی در ۹۰ درجه سانتی گراد
Fig. 2. The effect of molar ratio of β -cyclodextrin to anthocyanin on the anthocyanin stability after 100 min heat treatment at 90°C

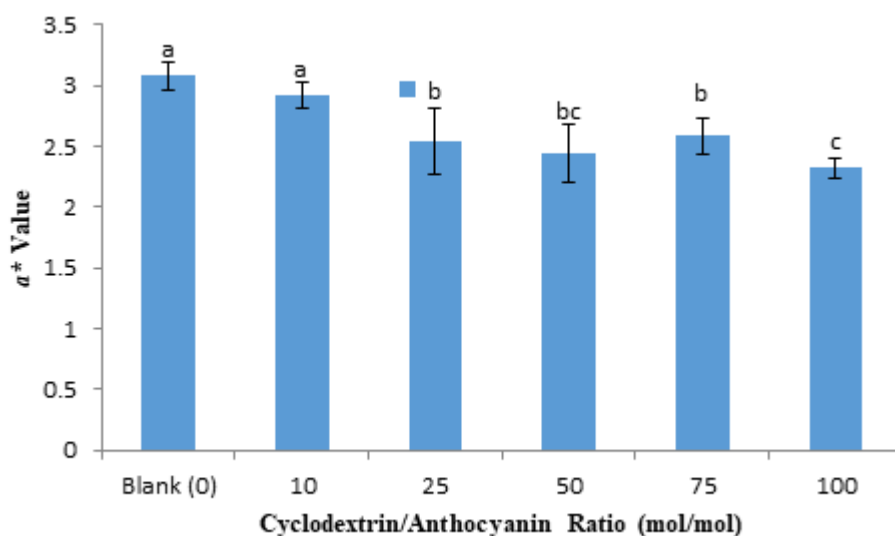


شکل ۳- تاثیر نسبت مولی آلفاسیکلودکسترین به آنتوسیانین بر پایداری آنتوسیانین پس از ۱۰۰ دقیقه تیمار حرارتی در ۹۰ درجه سانتی گراد
Fig. 3. The effect of molar ratio of α -cyclodextrin to anthocyanin on the anthocyanin stability after 100 min heat treatment at 90°C

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر سیکلودکسترین‌ها بر شاخص قرمزی
Table 1- The variance analysis of the effect of cyclodextrins on the a* value

Source	DF	SS	MS	F-Value	P-Value
T1	1	7.9138	7.91375	529.57	0.000
T2	1	2.6744	2.67435	178.96	0.000
T3	5	3.4392	0.68784	46.03	0.000
T1*T2	1	2.6744	2.67435	178.96	0.000
T1*T3	5	7.2338	1.44677	96.81	0.000
T2*T3	5	0.0942	0.01884	1.26	0.313
T1*T2*T3	5	0.0942	0.01884	1.26	0.313
Error	24	0.3586	0.01494		
Total	47	24.4825			

T1: heat treatment (before and after), T2: Cyclodextrin type (α and β), T3: Cyclodextrin/anthocyanin molar ratio (10:1 to 100:1)



شکل ۴- تاثیر نسبت مولی سیکلودکسترین‌ها به آنتوسیانین بر شاخص قرمزی نوشیدنی مدل پس از ۱۰۰ دقیقه تیمار حرارتی در ۹۰ درجه سانتی‌گراد

Fig. 4. The effect of molar ratio of cyclodextrins to anthocyanin on the a* value of the model drink after 100 min heat treatment at 90°C

پایداری آنتوسیانین‌ها با روش کوپیگماتتاسیون

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، کوپیگمان‌های خالص تاثیری بر پایداریسازی آنتوسیانین‌های نوشیدنی مدل نداشتند به طوری که میزان بقاء آنتوسیانین‌های نوشیدنی‌های حاوی کوپیگمان‌های خالص، مشابه نمونه شاهد بود و تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) با آن نداشتند. تنها عصاره نسترن کوهی در هر دو نسبت مولی ۵۰ و ۱۰۰ به ۱ (معادل گالیک اسید) به آنتوسیانین موجب افزایش بقاء آنتوسیانین شد. میزان ترکیبات فنولی کل عصاره نسترن کوهی ۱۴/۵۶ گرم (معادل گالیک اسید) بر لیتر و میزان فلاونوئید کل موجود در آن ۳۶۵ میلی‌گرم (معادل کوئرستین) بر لیتر به دست آمد. بنابراین، بر اساس نتایج مربوط به میزان ترکیبات فنولی کل و فلاونوئید کل در این پژوهش، این

این اثر متفاوت بتاسیکلودکسترین ممکن است به خاطر این باشد که عصاره Chokeberry دارای ترکیبات فنولی دیگری است که به واکنش با بتاسیکلودکسترین کمک می‌کند. بنابراین بتاسیکلودکسترین ممکن است در برخی از سیستم‌های غذایی جهت پایداری آنتوسیانین‌ها مفید واقع شود (Fernandes et al., 2013; Howard et al., 2013). نتایج این پژوهش نیز حاکی از تاثیر معنی‌دار بتاسیکلودکسترین (در نسبت مولی ۵۰ قسمت بتاسیکلودکسترین به ۱ قسمت مولی آنتوسیانین) و عدم تاثیر آلفاسیکلودکسترین بر پایداریسازی آنتوسیانین در نوشیدنی مدل بود که می‌تواند ناشی از بزرگتر بودن مولکول بتاسیکلودکسترین و توانایی آن در احاطه کردن مولکول‌های آنتوسیانینی باشد (Fernandes et al., 2013).

تحت تاثیر میزان و نوع کوپیگمان قرار گرفت به طوری که با افزودن کوترستین و روتین، این شاخص به طور معنی داری افزایش پیدا کرد که می تواند ناشی از حلالیت پایین این کوپیگمان ها در نوشیدنی مدل باشد. تغییر رنگ کلی نوشیدنی مدل حاوی عصاره نسترن کوهی نیز به طور معنی داری بیشتر از نمونه شاهد بود که این مورد نیز می تواند ناشی از حضور ترکیبات فنولی نامحلول در آب باشد.

افزایش بقاء آنتوسیانین می تواند به حضور تنوعی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره نسبت داده شود.

شاخص تغییر رنگ کل نشان دهنده تغییر رنگ نوشیدنی مدل حاوی کوپیگمان های مختلف پس از تیمار حرارتی (نسبت به قبل از تیمار حرارتی) می باشد. بنابراین ترجیح بر این است تا تغییر رنگ کل کمتر باشد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، شاخص تغییر رنگ کل

جدول ۲- تاثیر کوپیگمان های مختلف بر شاخص های بقاء آنتوسیانین و تغییر رنگ کل نوشیدنی مدل

Table 2- The effect of different copigments on the anthocyanin retention and total color change (ΔE) of the model drink

Copigman	Molar ratio of copigment/Anthocyanin	Anthocyanin retention (%)	ΔE
Blank	0	51.6 +1.11 ^a	1.37 +0.04 ^d
Galic acid	50:1	51.00 +0.28 ^a	1.68 +0.16 ^d
	100:1	46.26 +0.11 ^a	1.85 + 0.14 ^d
Quercetin	2.5:1	49.92 +0.23 ^a	4.01 +0.23 ^c
	5:1	48.58 +0.5 ^a	4.05 +0.68 ^c
Ferolic acid	50:1	48.46 +0.35 ^a	1.69 +0.11 ^d
	100:1	48.07 +0.69 ^a	1.71 +0.04 ^d
Rutin	10:1	49.20 +0.22 ^a	8.43 +0.37 ^b
	25:1	45.94 +1.88 ^a	13.82 +0.18 ^a
Rosehip extract	50:1	54.31 +0.17 ^b	4.73 +0.07 ^c
	100:1	58.84 +1.59 ^b	3.66 +0.24 ^c

خشک کن پاششی افزایش داد. آن ها بیان کردند که ترکیبات کوپیگمانی می تواند همانند محلول ها، تشکیل کمپلکس دهند و از این طریق از هیدراته شدن رنگدانه ها توسط رطوبت موجود در محیط جلوگیری کنند. از طرف دیگر، به خاطر ویژگی آنتی اکسیدانی، کوپیگمان های افزوده شده می توانند از اکسیداسیون آنتوسیانین ها جلوگیری به عمل آورند (Weber et al., 2017). Fan و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که کوپیگمان ها باعث افزایش شاخص قرمزی، کاهش شاخص روشنایی و تغییر رنگ کل نسبت به نمونه کنترل شدند. نتایج آن ها نشان داد که روتین و فرولیک اسید که بهترین اثرات را بر پایداری رنگدانه داشتند، دارای حجم مولکولی بزرگتر و انرژی واندروالسی نسبت به سایر اسیدهای فنولی بودند و بنابراین، ساختار کوپیگمان رابطه مهمی با اثر کوپیگمانتاسیونی بر آنتوسیانین دارد (Fan et al., 2019). Chung و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که با افزودن عصاره چای سبز (به میزان ۰/۲ درصد)، نیمه عمر تخریب رنگ آنتوسیانین از ۲/۹ روز به ۶/۷ روز افزایش یافت که احتمالاً به خاطر برهمکنش های هیدروفوبیک ترکیبات موجود در عصاره چای سبز با آنتوسیانین ها باشد. آن ها نتیجه گرفتند که افزودن کوپیگمان هایی از قبیل وانیلین، ممکن است موجب بهبود پایداری آنتوسیانین ها شود اما بوی وانیل را نیز به نوشیدنی اضافه می کند اما عصاره چای سبز بوی ضعیفی دارد. با این حال عصاره چای سبز دارای رنگ متمایل به زرد است که عمدتاً در ترکیب با آنتوسیانین ها پوشانده می شود. بنابراین تاثیر کوپیگمان ها بر طعم و رنگ، ملاحظات

Kanha و همکاران (۲۰۱۹) کوپیگمانتاسیون بین مولکولی سیانیدین ۳-گلیکوزاید با سه ترکیب فنولی بدون رنگ را (کاتکین، اسید فرولیک و دوپامین) در نسبت های مولی ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ بررسی کردند (Kanha et al., 2019). نتایج آن ها نشان داد که قوی ترین واکنش کوپیگمانتاسیون در نسبت مولی ۱:۱۰۰ کاتکین به دست آمد و اسید فرولیک و دوپامین در مرتبه های بعدی قرار داشتند. آن ها مشاهده کردند که شدت تخریب حرارتی رنگدانه با افزایش دمای حرارت از ۵۰ به ۹۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت. علاوه بر این، آن ها کاهش آنتوسیانین عصاره توت فرنگی را در حضور نسبت های مولی مختلف کاتکین (۱:۱۰۰ تا ۱:۱۰۰۰) پس از پاستوریزاسیون در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه بررسی کردند. عصاره کوپیگمان شده در نسبت ۱:۱۰۰ دارای کمترین I^* ، بیشترین C^* و کوچکترین زاویه h بود که نشانگر تشدید رنگ عصاره توت فرنگی است. حضور کاتکین در نسبت مولی ۱:۱۰۰، تخریب آنتوسیانین پس از پاستوریزاسیون را از ۲۲/۴۴ درصد (نمونه شاهد) به ۶/۶۷ درصد کاهش داد. Zhao و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده کردند که تفاوت های زیادی بین سیستم های مختلف پیگمان کوپیگمان وجود داشت و توانایی ایجاد پیوند با آنتوسیانین ها در کوترستین بیشتر از اپی کاتکین بود و گالیک اسید در مرتبه سوم قرار داشت (Zhao et al., 2020). Weber و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند که حضور کوپیگمان های روتین و اسید فرولیک به طور قابل توجهی پایداری آنتوسیانین ها را طی انبارداری پودر آنتوسیانینی تولید شده با استفاده از

نتیجه‌گیری

باتوجه به کاربرد عمده آنتوسیانین‌ها در صنایع غذایی از یک طرف و پایداری نسبتاً پایین آن‌ها در مقایسه با رنگ‌های سنتزی، پایداریسازی آن‌ها ضرورت دارد. به نظر می‌رسد که مستعدترین منبع آنتوسیانین در ایران، گلبرگ زعفران باشد و بنابراین پایداریسازی آنتوسیانین گلبرگ زعفران مورد بررسی قرار گرفت. آلفاسیکلودکسترین تاثیر معنی‌داری بر پایداریسازی آنتوسیانین نداشت اما بتاسیکلودکسترین موجب افزایش پایداری رنگدانه شد. اگرچه ترکیبات فنولی خالص تاثیری بر پایداریسازی حرارتی آنتوسیانین نداشتند اما عصاره نسترن کوهی به‌طور معنی‌داری موجب افزایش بقاء آنتوسیانین در نوشیدنی مدل شد که می‌تواند ناشی از وجود تنوعی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در این عصاره باشد. درنهایت، استفاده از عصاره‌های فنولی گیاهان و سایر ترکیبات از قبیل (سیستئین، اسیدهای آلی و کاتیون‌ها) جهت کوپیگمانتاسیون و پایداریسازی عصاره آنتوسیانینی سایر منابع (از قبیل زرشک، کلم قرمز، انگور قرمز) پیشنهاد می‌گردد تا تاثیر آن روشن‌تر گردد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری جهاد دانشگاهی در قالب طرح با عنوان «پایداریسازی حرارتی عصاره آنتوسیانینی گلبرگ زعفران با استفاده از روش‌های کوپیگمانتاسیون و ریزپوشانی و کاربرد آن در مدل غذایی» با کد ۶۰۲۳-۲۰ و همچنین حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) در قالب طرح با عنوان «پایداریسازی حرارتی بتالائین چغندر قرمز با استفاده از روش‌های کوپیگمانتاسیون و ریزپوشانی و کاربرد آن در نوشیدنی و کیک» با شماره ۹۷۰۰۹۲۱۲ انجام شده است.

است که باید در انتخاب ترکیبات پلی‌فنولی مورد توجه واقع شود (Chung et al., 2016). Kopjar و همکاران (۲۰۱۴) پایداری آنتوسیانین‌ها با عصاره چای سبز را به کوپیگمانتاسیون نسبت دادند که موجب می‌شود تا از حمله مولکول‌های آب به یون فلاویلیوم و کاهش رنگ آن جلوگیری کنند (Kopjar et al., 2014). Mollov و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند که با افزودن عصاره گلبرگ، زمان نیمه عمر آنتوسیانین توت فرنگی از ۱۳۱ روز به ۱۷۳ روز افزایش یافت. همچنین پس از ۴ ساعت حرارت‌دهی، اختلاف رنگ کل در نوشیدنی‌های حاوی عصاره گلبرگ کمتر از نمونه کنترل بود و پایداری رنگ بیشتر بود (Mollov et al., 2007). Ertan و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که اسید گالیک و عصاره پوست انار پایداری بیشتری را برای آنتوسیانین‌ها در نکتار آلبالو به ارمغان آورد اگرچه کمترین کدورت نیز در آغاز نگهداری و در نکتار حاوی عصاره پوست انار مشاهده شد و بنابراین عصاره پوست انار را به‌عنوان بهترین کوپیگمان (بدون توجه به نوع شیرین‌کننده) انتخاب کردند (Ertan et al., 2018).

اگرچه بسیاری از تحقیقات انجام شده حاکی از تاثیر معنی‌دار و مثبت کوپیگمان‌های خالص مختلف بر پایداری آنتوسیانین‌ها بودند اما در تحقیق حاضر چنین نتیجه‌ای حاصل نشد. این امر می‌تواند به دلیل زمان طولانی حرارت‌دهی (۱۰۰/۸ دقیقه) در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد باشد که معادل زمان نیمه‌عمر آنتوسیانین عصاره گلبرگ زعفران در نوشیدنی مدل بود. علاوه بر این، ماهیت عصاره‌های آنتوسیانینی و ترکیبات مختلف فنولی موجود در آن‌ها نیز می‌تواند تاثیر مهمی بر کوپیگمانتاسیون گذاشته باشد. با این حال، عصاره نسترن کوهی موجب افزایش بقاء آنتوسیانین گردید که می‌تواند به وفور و تنوع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن نسبت داده شود. اگرچه به نظر می‌رسد که عامل اصلی کوپیگمانتاسیون در عصاره نسترن کوهی، ترکیبات فنولی باشد اما سایر ترکیبات از قبیل کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها نیز ممکن است اثرگذار بوده باشند و نیاز به بررسی بیشتری دارد.

منابع

- Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11(3), 1139-1144. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88467-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88467-8)
- Bolourian, Sh. (2020). Optimization of the extraction the anthocyanin extract of the saffron petal. Research project, ACECR, Research institute of the Food Science and technology. [In Persian]
- Bourvellec, C. (2003). *Association entre les procyanidols et les polymères pariétaux de pommes: quantification et conséquences* (Doctoral dissertation, Rennes 1).
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P. & Ferreira, I.C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety*, 13, 377–99. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T. & Meireles, M.A.A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems: an overview. *Food Research International*, 44, 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007>
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food drug analysis*, 10(3), 178-182.

7. Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. & McClements, D.J. (2015). Enhanced stability of anthocyanins based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation. *Food Chemistry*, 76, 761–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.003>
8. Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., & McClements, D. J. (2016). Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. *Food Chemistry*, 201, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.051>
9. Cortez, R., Luna- Vital, D. A., Margulis, D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety*, 16(1), 180-198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>
10. Einafshar, S. (2018) the production of the colorants and natural antioxidant from the saffron petal waste, *Journal of Saffron*, 1(1), 25-33. [In Persian]
11. Ercisli, S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chemistry*, 104(4), 1379-1384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.053>
12. Ertan, K., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2018). Effect of sweeteners on anthocyanin stability and colour properties of sour cherry and strawberry nectars during storage. *Journal of food Science and Technology*, 55(10), 4346-4355. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3387-4>
13. Fan, L., Wang, Y., Xie, P., Zhang, L., Li, Y., & Zhou, J. (2019). Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation. *Food chemistry*, 275, 299-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.103>
14. Fernandes, A., Azevedo, J., Mateus, N. & Freitas, V.D. (2013). Effect of cyclodextrins on the thermodynamic and kinetic properties of cyanidin-3-O-glucoside. *Food Research International*, 51(2), 748–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.037>
15. Ge, J., Yue, P., Chi, J., Liang, J., & Gao, X. (2018). Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan. *Food Hydrocolloids*, 74, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.029>
16. Howard, L.R, Brownmiller, C., Prior, R.L. & Mauromoustakos, A. (2013). Improved stability of chokeberry juice anthocyanins by β -cyclodextrin addition and refrigeration. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, 61(3), 693–9. <https://doi.org/10.1021/jf3038314>
17. Jafari, S. M., Mahdavi-Khazaei, K., & Hemmati-Kakhki, A. (2016). Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. *Carbohydrate Polymer*, 140, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.079>
18. Kanha, N., Surawang, S., Pitchakarn, P., Regenstein, J. M., & Laokuldilok, T. (2019). Copigmentation of cyanidin 3-O-glucoside with phenolics: Thermodynamic data and thermal stability. *Food Bioscience*, 30, 100-419. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100419>
19. Khazaei, K.M., Jafari, S.M., Ghorbani, M. & Hemmati Khakki, A. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their stability. *Carbohydrate Polymer*, 105, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.042>
20. Kopjar, M., Bilić, B., & Piližota, V. (2014). Anthocyanins, phenols, and antioxidant activity in blackberry juice with plant extracts addition during heating. *Acta alimentaria*, 43(2), 333-343.
21. Li, X., Xu, J., Tang, X., Liu, Y., Yu, X., Wang, Z. & Liu, W. (2016). Anthocyanins inhibit trastuzumab resistant breast cancer in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Report*, 13, 4007–4013.
22. Mazza, G. & Miniati, E. (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton: CRC Press.
23. Mollov, P., Mihalev, K., Shikov, V., Yoncheva, N., & Karagyozev, V. (2007). Colour stability improvement of strawberry beverage by fortification with polyphenolic copigments naturally occurring in rose petals. *Innovative Food Science Emerging Technology*, 8(3), 318-321. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.004>
24. Saberian, H. (2018). The comparison of the quality properties of the rosehip powder of some regions of Iran with commercial sample, *Journal of food Science and Technology*, 15 (82), 139-149. [In Persian]
25. Saberian, H. (2020). Production of food supplement of rosehip as a capsule to treat arthritis, ACECR, Research institute of the Food Science and technology. [In Persian]
26. Saberian, H., Hamidi-Esfahani, Z., & Abbasi, S. (2013). Effect of pasteurization and storage on bioactive components of Aloe vera gel. *Nutrition & Food Science*, 43(2), 175-183.
27. Shikov, V., Kammerer, D. R., Mihalev, K., Mollov, P., & Carle, R. (2008). Heat stability of strawberry anthocyanins in model solutions containing natural copigments extracted from rose (*Rosa damascena* Mill.) petals. *Journal of agriculture food Chemistry*, 56(18), 8521-8526. <https://doi.org/10.1021/jf801946g>
28. Sui, X., Dong, X. & Zhou, W. (2014). Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of 2 anthocyanins in aqueous solution. *Food Chemistry*, 163, 163–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.075>

29. Weber, F., Boch, K., & Schieber, A. (2017). Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.042>
30. Zhao, X., Ding, B. W., Qin, J. W., He, F., & Duan, C. Q. (2020). Intermolecular copigmentation between five common 3-O-monoglucosidic anthocyanins and three phenolics in red wine model solutions: The influence of substituent pattern of anthocyanin B ring. *Food chemistry*, 326, 126960. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126960>

Contents

Evaluation of probiotic and antifungal properties of the yeast isolated from buckwheat sourdough	575
Shahryari, S., Sadeghi, A. Ebrahimi, M. Sadeghi Mahoonak, A. Moayed, A.	
Detection of Salmonella spp. in raw chicken products using specific primer-probe set by Real time-PCR method	589
Tajik Toughan, K., Edalatian Dowom, M. Mortazavi, S. A. Javadmanesh, A.	
Determination of chemical composition and evaluation the antimicrobial activity of <i>Olea europaea</i> leaf extract against pathogenic bacteria “in vitro”	603
Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. Rahmati-Joneidabad, M.	
Formulation optimization of baguette containing <i>Ganoderma leucidum</i>	615
Azizkhani, S., Nateghi, L.	
Evaluation of technological and functional properties of breakfast cereal based on flaxseed oil cake and broken rice flour	631
Abbasi, A., Koocheki, A., Milani, E., Mohebbi, M.	
Effect of batch dryer with agitator and moisture controller on drying paddy and milling factor	648
Latifi, A., Kiehbardroudezhad, M., Alizadeh, M.	
Encapsulation of aqueous extract of <i>Arctium lappa</i> L. root and study its effect on physicochemical and functional properties of Synbiotic orange-carrot juice	657
Esmaeili, F., Hashemiravan, M., Eshaghi, M. R., Gandomi, H.	
The effect of glycerol and nanocellulose on hydrophilic and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose composites	681
Amidi-Fazli, F., Golmohammadzadeh, S.	
Evaluation of total phenols and flavonoids, antioxidant power, and antimicrobial activity of <i>Levisticum officinale</i> Koch essential oil against some spoilage fungi causing apple and orange rot	699
Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M.	
Effect of wheat flour fortification with sesame flour on properties of Sangak and Barbari flour, dough and bread	711
Naderi, A., Zarringhalami, S.	
Enzymatic extraction of sulfated polysaccharide from the skin of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) and evaluation of its chemical, antioxidant and functional properties	725
Naghdi, Sh., Rezaei, M., Abdollahi, M., Tabarsa, M.	
Extraction of acid-soluble and pepsin-soluble collagens from common carp scales (<i>Cyprinus carpio</i>) and determination of their characteristics	740
Zargar, M., Shabanpour, B., Pourashouri, P., Zabihi Neyshabouri, E.	
Effects of chia seed extract on chemical and sensory properties of sweet cream butter during refrigerated storage	751
Sadri Saeen, Z., Khani, M., Fadaei Noghani, V.	
Effect of cyclodextrins and co-pigmentation on the thermal stability of the anthocyanin extract of Saffron petal in the model drink	765
Saberian, H., Pasban, V.	

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 18

No. 5

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.



Contents

Evaluation of probiotic and antifungal properties of the yeast isolated from buckwheat sourdough	575
Shahryari, S., Sadeghi, A. Ebrahimi, M. Sadeghi Mahoonak, A. Moayedi, A.	
Detection of Salmonella spp. in raw chicken products using specific primer-probe set by Real time-PCR method	589
Tajik Toughan, K., Edalatian Dowom, M. Mortazavi, S. A. Javadmanesh, A.	
Determination of chemical composition and evaluation the antimicrobial activity of Olea europaea leaf extract against pathogenic bacteria "in vitro"	603
Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. Rahmati-Joneidabad, M.	
Formulation optimization of baguette containing Ganoderma leucidum	615
Azizkhani, S., Nateghi, L.	
Evaluation of technological and functional properties of breakfast cereal based on flaxseed oil cake and broken rice flour	631
Abbasi, A., Koocheki, A., Milani, E., Mohebbi, M.	
Effect of batch dryer with agitator and moisture controller on drying paddy and milling factor	648
Latifi, A., Kiehbardrounizhad, M., Alizadeh, M.	
Encapsulation of aqueous extract of Arctium lappa L. root and study its effect on physicochemical and functional properties of Synbiotic orange-carrot juice.....	657
Esmaeili, F., Hashemiravan, M., Eshaghi, M. R., Gandomi, H.	
The effect of glycerol and nanocellulose on hydrophilic and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose composites	681
Amidi-Fazli, F., Golmohammadzadeh, S.	
Evaluation of total phenols and flavonoids, antioxidant power, and antimicrobial activity of Levisticum officinale Koch essential oil against some spoilage fungi causing apple and orange rot	699
Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M.	
Effect of wheat flour fortification with sesame flour on properties of Sangak and Barbari flour, dough and bread	711
Naderi, A., Zarringhalami, S.	
Enzymatic extraction of sulfated polysaccharide from the skin of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and evaluation of its chemical, antioxidant and functional properties	725
Naghdi, Sh., Rezaei, M., Abdollahi, M., Tabarsa, M.	
Continue Content in cover	